

Tatiana de Lima Alves

**DETECÇÃO DE METABÓLITOS DO ÁCIDO CLOROGÊNICO  
E DE METILXANTINAS EM PLASMA E URINA DE  
INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS, APÓS A INGESTÃO DE ERVA-  
MATE (*Ilex paraguariensis*, A. St.-Hil.)**

Dissertação submetida ao Programa  
de Pós Graduação em Farmácia da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do Grau de  
Mestre em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz da  
Silva

Florianópolis  
2016



Tatiana de Lima Alves

**DETECÇÃO DE METABÓLITOS DO ÁCIDO CLOROGÊNICO  
E DE METILXANTINAS EM PLASMA E URINA DE  
INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS, APÓS A INGESTÃO DE ERVA-  
MATE (*Ilex paraguariensis*, A. St.-Hil.)**

Florianópolis, 11 de março de 2016.

---

Prof. Dr Tania Beatriz Creczynski Pasa  
Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Dr. Edson Luiz da Silva  
Orientador  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Simone Gonçalves Cardoso  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Dr.<sup>a</sup> Renata Dias de Mello Castanho Amboni  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Dr. Euclides Lara Cardozo Junior  
Universidade Paranaense



Este trabalho é dedicado ao meu pai  
Airton (*in memoriam*) e à minha mãe  
Valdeci pela educação, amor, carinho  
e dedicação.



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao Professor Dr. Edson da Silva pela oportunidade, conhecimento compartilhado e contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço à Deus pela vida, especialmente pela família maravilhosa a qual me permitiu nascer. À minha mãe Valdeci pelo exemplo, incentivo, amor, dedicação, orações e preocupação para que eu estivesse sempre andando pelo caminho correto. O meu amor e admiração por você é infinito.

À minha amiga e companheira de mestrado Fernanda Alves pelos inúmeros momentos de dificuldade os quais compartilhamos, e é claro aos momentos de alegrias que não foram poucos. Mas com certeza expresso aqui principalmente a minha gratidão pelas horas de descontração durante a pesquisa tornando os meus dias mais leves mesmo com a turbulência das responsabilidades.

Às amigadas verdadeiras que construí nesta jornada, Camilla Amaral, Alyne Cardoso, Tatiane Cristofolini por estarem sempre contribuindo tanto para o meu crescimento pessoal com palavras de carinho nas horas difíceis, quanto nas contribuições para o desenvolvimento do meu projeto. Agradeço às colegas de laboratório Tais, Marina, Roberta, Heloisa, Andreia, Ivana, pois sem vocês a rotina e estes anos não seriam os mesmos.

Às minhas colegas farmacêuticas Taisa Baccarin e Isabela Toaldo pelos ensinamentos com o HPLC, pela paciência e o carinho em todos os momentos.

Não poderia deixar de agradecer à minha companheira de todos os dias Daiane Faoro, que não só dividiu comigo o mesmo teto, mas também compartilhou dos momentos de alegrias e tristezas. Aos meus amigos que entenderam a minha ausência em alguns momentos e que ainda assim me transmitiram muita energia positiva.

Aos nossos voluntários, por terem aceitado participar da nossa pesquisa, sem vocês nada disso seria possível.

Muito obrigada nunca será suficiente para demonstrar a grandeza do que recebi de vocês. Peço a Deus que os recompense à altura.

***Tatiana de Lima Alves***



## **RESUMO**

A erva-mate (*Ilex paraguariensis*), planta originária da América do Sul, é consumida tradicionalmente na forma de bebida quente (“chimarrão”), fria (“tererê”) ou chá mate tostado. Diversas propriedades biológicas da erva-mate são atribuídas à presença de compostos fenólicos, em especial aos ácidos clorogênicos (ACGs), principais representantes dessa classe de compostos encontrados nas folhas da planta, os quais são responsáveis pelas atividades antioxidante, antimicrobiana e anticarcinogênica. Estudos sobre a biodisponibilidade dos ACGs da erva-mate são escassos e o conhecimento sobre a absorção desses compostos em seres humanos é essencial para justificar as propriedades atribuídas aos mesmos. Desta maneira, o objetivo do presente estudo foi detectar e quantificar os ácidos clorogênicos e seus metabólitos e as metilxantinas no plasma e na urina de indivíduos saudáveis, após a ingestão aguda de extrato nebulizado padronizado de erva-mate verde. Participaram deste estudo oito indivíduos saudáveis (5 mulheres/3 homens), com idades entre 21 e 28 anos. Após jejum de 12 h, amostras de sangue foram coletadas antes (basal) e após 1, 1,5, 2, 3 e 4 h da ingestão da bebida. As amostras de urina foram coletadas no período basal e nos intervalos de 0 a 2 h e de 2 a 4 h após a ingestão da bebida (15 mg/mL). A detecção dos compostos foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). No plasma, foram detectados ACGs intactos, ácido dihidrocafeico (DHCA) e dois possíveis metabólitos nas formas livre e conjugada, com concentração máxima após 1,5 e 2 h da ingestão do extrato padronizado. Após a hidrólise enzimática com  $\beta$ -glicuronidase e sulfatase, foram detectados, além do DHCA, outros sete possíveis metabólitos. Nas amostras de urina, foram identificados os compostos 3-CQA, 4-CQA, 5-CQA e os ácidos cafeico, sinápico, *p*-cumárico, vanílico, além de outros três possíveis metabólitos com espectro de absorção semelhante àqueles dos ACGs. As metilxantinas teobromina e cafeína também foram detectadas no plasma de alguns indivíduos, ocorrendo aumento na concentração das mesmas após a ingestão. Na urina, foi detectada apenas a cafeína em três indivíduos. Além disto, observou-se grande variação interpessoal nos perfis de absorção dos compostos fenólicos e metilxantinas no plasma e na urina dos participantes. Com base nesses resultados, é possível afirmar que os CGAs e metilxantinas presentes na erva-mate são rapidamente absorvidos, metabolizados e excretados na urina de seres humanos. Estudos futuros são necessários para a identificação dos possíveis

**Deteção de metabólitos do ácido clorogênico e de metilxantinas em plasma e urina de indivíduos saudáveis, após a ingestão de erva-mate (*Ilex paraguariensis*, A. st.-hil.)**

metabólitos detectados, para que se torne viável o conhecimento das formas bioativas da erva-mate e respectivos mecanismos de ação.

**Palavras chave:** *Ilex paraguariensis*, Erva-Mate, Ácidos Clorogênicos, Metilxantinas; Absorção, Metabólitos, Plasma, Urina.

## ABSTRACT

Yerba mate (*Ilex paraguariensis*), a native plant species from Southern America, is traditionally consumed as hot (“chimarrão”) or cold beverages (“tererê”) or as toasted mate tea. Several biological properties of yerba mate are due to the presence of phenolic compounds, especially chlorogenic acids (CGAs), the main component of this compound class found in the leaves plant, which are responsible for the antioxidant, antimicrobial and anticancer activities. Studies on the CGAs bioavailability of yerba mate are scarces and the knowledge on absorption and metabolism of these compounds in humans is essential to justify the properties attributed to them. Therefore, the objective of this study was to detect and quantify CGAs, their metabolites and methylxanthines in plasma and urine of healthy individuals after acute intake of an nebulized, standardized extract of green yerba mate. Eight subjects participated in this study (5 female/3 male), aged between 21 and 28 y. After a 12 h fasting, blood samples were collected before (baseline) and 1, 1.5, 2, 3 and 4 h after beverage intake. Urine samples were collected at the baseline period and at intervals from 0 to 2 h and from 2 to 4 h after yerba mate consumption (15 mg/mL). The compounds detection was performed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). In plasma, intact CGAs, dihydro caffeic acid (DHCA), and two possible metabolites were detected in the free and conjugated form, with maximum concentration after 1.5 and 2 h of nebulized yerba mate extract intake. After enzymatic hydrolysis with  $\beta$ -glucuronidase and sulfatase, in addition to DHCA, other seven possible metabolites were detected. In urine samples, the compounds 3-CQA, 4-CQA, 5-CQA and caffeic, sinapic, *p*-cumaric and vanillic acids were identified, as well as other three possible metabolites with similar absorption spectrum to CGAs. The methylxanthines theobromine and caffeine were also detected in the plasma of few individuals, occurring an increase in their concentration after mate ingestion. In urine, the caffeine was detected only in three individuals. Moreover, it was observed a great interpersonal variation in the profile of absorbed compounds both in plasma and urine samples of participants. Based on these results, we may affirm that the CQAs present in yerba mate are rapidly absorbed, metabolized and excreted through urine in humans. Further studies are necessary to identify the possible detected metabolites, in order to know the bioactive structures of yerba mate and their respective mechanisms in humans.

**Detection of metabolites of chlorogenic acid and methylxanthines in plasma and urine of health individuals, after yerba mate intake (*Ilex paraguariensis* A. St.- Hil.)**

**Keywords:** *Ilex paraguariensis*, Yerba Mate, Chlorogenic Acids, Methylxantines, Absorption, Metabolites, Plasma, Urine.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Estrutura química dos principais compostos fenólicos da erva-mate (OLIVEIRA, 2013). ..... 26
- Figura 2** – Estrutura química das metilxantinas: (GNOATTO; SCHENKEL; BASSANI, 2005). ..... 26
- Figura 3** - Estrutura química básica de saponinas isoladas de *Ilex paraguariensis* derivadas do ácido ursólico (TAKETA; BREITMAIER; SCHENKEL, 2004). ..... 27
- Figura 4** – Estrutura química do 5-CQA e dos ácidos que compõem os ácidos clorogênicos (DE OLIVEIRA; BASTOS, 2011). ..... 31
- Figura 5** – Curva de calibração do padrão 5-cafeoilquínico (5-CQA). 49
- Figura 6** - Cromatograma representativo do perfil das metilxantinas e dos compostos fenólicos do extrato nebulizado padronizado de erva-mate verde obtido em CLAE ( $\lambda = 280$  nm e 325 nm). ..... 53
- Figura 7** - Espectros de absorção DAD dos compostos encontrados no ..... 54
- Figura 8** - Cromatogramas representativos do teste de recuperação dos ácidos monocateoilquínicos (CQA) após a adição de três padrões em amostra de plasma ( $\lambda = 325$  nm). ..... 58
- Figura 9** – Cromatograma representativo da detecção de ácidos clorogênicos intactos no plasma após 1,5 h da ingestão de erva-mate ( $\lambda = 325$  nm). ..... 61
- Figura 10** - Perfil dos compostos fenólicos detectados no plasma de indivíduos saudáveis, sem tratamento enzimático com  $\beta$ -glicuronidase e sulfatase, após a ingestão de 300 mL de extrato nebulizado padronizado de erva-mate verde. .... 65
- Figura 11** - Perfil dos compostos fenólicos detectados no plasma de indivíduos saudáveis após tratamento enzimático com  $\beta$ -glicuronidase e sulfatase, após a ingestão de 300 mL de ENPEMV. .... 68

<b>Figura 12</b> - Cromatogramas representativo da detecção de metilxantinas em amostras de plasma. A e B: amostras sem a hidrólise enzimática; C e D: amostras que passaram por hidrólise enzimática com $\beta$ -glicuronidase e sulfatase, antes (basal) e após 3 horas da ingestão do ENPEMV ( $\lambda = 280$ nm). .....	70
<b>Figura 13</b> - Perfil da cafeína e da teobromina quantificados no plasma de indivíduos saudáveis após a ingestão de 300 mL de extrato de erva-mate. ....	72
<b>Figura 14</b> - Concentração urinária de ácido dihidrocafeico de oito indivíduos após a ingestão de extrato de erva-mate. ....	76
<b>Figura 15</b> - Espectro de absorção do ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA) e dos metabólitos urinários não identificados e quantificados em equivalentes de 5-CQA. ....	77
<b>Figura 16</b> – Concentração urinária de metabólitos de ácidos fenólicos na forma livre e de metabólitos conjugados, após a ingestão aguda de erva-mate. ....	78
<b>Figura 17</b> - Cromatograma representativo de compostos fenólicos em amostras de urina obtida antes e no período de 2 a 4 h da ingestão do extrato de erva-mate. A e B: amostras sem a hidrólise enzimática; C e D: amostras que passaram por hidrólise enzimática com $\beta$ -glicuronidase e sulfatase ( $\lambda = 325$ nm). ....	81
<b>Figura 18</b> - Cromatograma representativo da presença de cafeína em uma amostra de urina obtida antes, no período de 0-2 e 2 a 4 h da ingestão do extrato de erva-mate em amostras que passaram por hidrólise enzimática com $\beta$ -glicuronidase e sulfatase ( $\lambda = 280$ nm). ....	84

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Condições cromatográficas para análise em CLAE. .... 48

**Tabela 2** - Teor de saponinas, fenólicos totais e medidas da capacidade antioxidante total (FRAP e TAC) no extrato nebulizado padronizado de erva-mate verde e tostada..... 50

**Tabela 3** – Teor de compostos fenólicos e metilxantinas no extrato nebulizado padronizado de erva-mate verde..... 52

**Tabela 4** - Teor de ácidos clorogênicos (ACGs) e metilxantinas no extrato nebulizado padronizado de erva-mate..... 52

**Tabela 5** - Características bioquímicas e antropométricas dos voluntários (n = 8)..... 56

**Tabela 6** - Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) dos compostos presentes no extrato de erva-mate. .... 59

**Tabela 7** - Quantificação dos compostos detectados ( $\mu\text{g/mL}$ ) no plasma de indivíduos saudáveis sem tratamento enzimático com  $\beta$ -glicuronidase e sulfatase, antes (basal) e após a ingestão de 300 mL de extrato nebulizado padronizado de erva-mate verde..... 64

**Tabela 8** - Quantificação dos compostos detectados ( $\mu\text{g/mL}$ ) no plasma de indivíduos saudáveis após tratamento enzimático com  $\beta$ -glicuronidase e sulfatase, antes (basal) e após a ingestão de 300 mL de extrato nebulizado padronizado de erva-mate verde..... 69

**Tabela 9** - Concentração urinária dos metabólitos de ácidos clorogênicos detectados sem tratamento enzimático com  $\beta$ -glicuronidase e sulfatase de cada indivíduo após 4 horas do consumo agudo de erva-mate..... 74

**Tabela 10** - Concentração urinária dos metabólitos de ácidos clorogênicos identificados após tratamento enzimático com  $\beta$ -glicuronidase e sulfatase de cada indivíduo após 4 horas do consumo agudo de erva-mate. .... 79

<b>Tabela 11</b> - Concentração urinária de cafeína após tratamento enzimático com $\beta$ -glicuronidase e sulfatase identificada em três indivíduos após 4 horas do consumo agudo de erva-mate. ....	83
--	----



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ACGs	Ácidos clorogênico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAD	Arranjo de Diodos
DHCA	Ácido Dihidrocafeico
DP	Desvio Padrão
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
ENPEM	Extrato Nebulizado Padronizado de Erva-mate
ENPEMT	Extrato Nebulizado Padronizado de Erva-mate tostada
ENPEMV	Extrato Nebulizado Padronizado de Erva-mate verde
HU	Hospital Universitário
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
LD	Limite de Detecção
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LQ	Limite de Quantificação
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TEAC	Capacidade Antioxidante Equivalente de Trolox
TROLOX	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico
TPTZ	2,4,6-Tri(2-piridil)-s-triazina
TR	Tempo de Retenção
VCM	Volume Corpuscular Médio
VLDL	Lipoproteína de Densidade Muito Baixa
UDESC	Universidade do Estado de Santa Catarina
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UV	Ultravioleta



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>23</b>
2.1 ERVA-MATE ( <i>ILEX PARAGUARIENSIS</i> , A. ST.- HIL.).....	23
2.2 COMPOSTOS BIOATIVOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS ATRIBUÍDAS À ERVA-MATE.....	25
2.3 COMPOSTOS FENÓLICOS .....	27
2.4 ÁCIDOS FENÓLICOS.....	29
2.5 ÁCIDOS CLOROGÊNICOS (ACGs).....	30
2.5.1 Absorção e biodisponibilidade dos ácidos clorogênicos...	31
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	37
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	37
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>39</b>
4.1 EQUIPAMENTOS, MATERIAIS E REAGENTES .....	39
4.2 MÉTODOS .....	40
4.2.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO NEBULIZADO PADRONIZADO DE ERVA-MATE VERDE E TOSTADA .....	40
4.2.2 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS ANALÍTICOS.....	43
4.2.3 PREPARO DA BEBIDA DE ERVA-MATE .....	44
4.2.4 ESTUDO <i>IN VIVO</i> .....	44
4.2.5 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS PARA AS ANÁLISES EM CLAE.....	47
4.2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	49
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
5.1 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO DE ERVA-MATE.....	50
5.1.1 Teor de saponinas, fenóis totais e medidas da capacidade antioxidante total .....	50
5.1.2 Caracterização dos compostos fenólicos e metilxantinas do extrato nebulizado padronizado de erva-mate por CLAE.....	51
5.3 CARACTERÍSTICAS BIODEMOGRÁFICAS DOS INDIVÍDUOS .....	55
5.4 ANÁLISE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS <i>IN VIVO</i> APÓS INGESTÃO DO EXTRATO NEBULIZADO PADRONIZADO DE ERVA-MATE VERDE .....	60

5.4.1 Identificação de compostos fenólicos e metilxantinas no plasma por CLAE .....	60
5.4.2 Identificação e quantificação de compostos fenólicos em urina por CLAE .....	72
5.4.2 Identificação e quantificação de metilxantinas em urina por CLAE .....	83
6 CONCLUSÃO .....	85
REFERÊNCIAS .....	87
APÊNDICE A – QUESTIONÁRIO DE INCLUSÃO AO ESTUDO .....	107
<i>Questionário Clínico</i> .....	107
APÊNDICE B – ORIENTAÇÕES AOS PARTICIPANTES .....	109
ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....	111

## 1 INTRODUÇÃO

A *Ilex paraguariensis* (A. St.-Hilaire, Aquifoliaceae), conhecida popularmente como erva-mate, é uma bebida consumida diariamente por uma grande parte da população do Sul do Brasil, Argentina, Paraguai, Uruguai e em menor quantidade, do Chile. A indústria ervateira tem um mercado consolidado nos estados do Sul, e um mercado potencial nos estados do Sudoeste e região Central do Brasil, com o hábito de consumo do chimarrão, tererê ou chá-mate. Considera-se que essas bebidas são especialmente consumidas no Mercosul, porém este mercado não se limita apenas às fronteiras brasileiras (ANTONI, 1995; VALDUGA, 2002).

As propriedades biológicas da erva mate são atribuídas à presença de compostos bioativos, como os compostos fenólicos (ácidos clorogênicos, e em menor quantidade, os flavonoides rutina e quercetina), as metilxantinas (cafeína e teobromina), e as saponinas. Os efeitos estimulantes da erva mate são atribuídos às metilxantinas, enquanto as saponinas presentes no mate são responsáveis pela atividade anti-inflamatória, antifúngica, coleréticas e parte dos efeitos hipocolesterolêmico e anti-obesogênico. Entretanto, acredita-se que a maior parte das propriedades biológicas da erva mate sejam, provavelmente derivadas dos ácidos fenólicos (BASTOS et al., 2007a; HECK; DE MEJIA, 2007; SPARG; LIGHT; VAN STADEN, 2004).

Os compostos fenólicos são substâncias do metabolismo secundário das plantas e atuam principalmente como agentes antioxidantes. Nos últimos anos, houve grande aumento na investigação da ocorrência desses compostos em alimentos e bebidas devido aos efeitos benéficos dos mesmos à saúde humana (STRASSMANN et al., 2008; ANESINI et al., 2012). Plantas com potencial antioxidante têm a capacidade de eliminar radicais livres, que são considerados moduladores de doenças como o câncer, artrite reumática, doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e pulmonares, dentre outras, pois desempenham papel direto na patogênese dessas desordens (DE MEJÍA et al., 2010).

Os compostos pertencentes à família do ácido clorogênico são os principais ácidos fenólicos presentes na erva-mate (GUGLIUCCI; BASTOS, 2009). Diversas propriedades biológicas do ácido clorogênico já foram reportadas, dentre elas atividade antibacteriana, antioxidante e anticarcinogênica (MENG et al., 2013). Os ácidos clorogênicos são compostos fenólicos solúveis em água formados pela esterificação de ácidos *trans*-cinâmicos, como os ácidos cafeico, ferúlico e *p*-cumárico com o ácido quínico (CLIFFORD, 1989).

Com base nos resultados de vários estudos, tem sido atribuído aos compostos fenólicos a diminuição de risco de diversas doenças após a ingestão de frutas e verduras (CROWE et al., 2011; DEL RIO et al., 2013). Entretanto, pouco se sabe sobre quais são as formas bioativas *in vivo* dos ácidos fenólicos e os mecanismos pelos quais eles podem contribuir para a prevenção de doenças (HELENO et al., 2015).

O metabolismo e a biodisponibilidade dos compostos funcionais dos alimentos, assim como as suas atividades, têm recebido grande atenção nos últimos anos. Devido à degradação enzimática que esses compostos podem sofrer no sistema digestório, eles podem não ser absorvidos na forma inalterada ou intacta, e sim na forma de derivados e/ou metabólitos. O conhecimento da distribuição dos compostos bioativos nos tecidos e em quais tecidos/órgãos onde eles podem de fato exercer as suas atividades é essencial para a avaliação de suas formas biológicas (TAKENAKA; NAGATA; YOSHIDA, 2000).

De acordo com o nosso conhecimento, não existem, até este momento, dados sobre a distribuição dos ácidos fenólicos da erva-mate e seus metabólitos no organismo humano. Portanto, este estudo teve como objetivo detectar os compostos bioativos pertencentes à família do ácido clorogênico no plasma e na urina de indivíduos saudáveis, após a ingestão aguda de um extrato padronizado de erva-mate.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*, A. St.- Hil.)

A erva-mate (*Ilex paraguariensis*, St.- Hil.), pertencente à família Aquifoliaceae, é uma planta nativa da região sul americana, que compreende o sul do Brasil, Paraguai, Uruguai e nordeste da Argentina. Há séculos os nativos da região utilizavam as folhas de erva-mate para preparar uma bebida estimulante, a qual ficou conhecida como “chimarrão” ou “mate” no Brasil, Argentina, Uruguai e Paraguai, que é preparado com água quente. Outras bebidas derivadas da erva-mate surgiram, posteriormente, como o “mate cocido” na Argentina e Uruguai, o qual se refere ao chá com folhas secas e moídas de erva-mate verde preparado na forma de infusão, usualmente comercializado em sachês, pode ser preparado com água quente ou fria, e a adição de açúcar é opcional, e o “tereré” como é consumido no Paraguai e no meio-oeste do Brasil, é feito com as folhas secas e moídas de erva-mate verde e água fria. Essas bebidas são amplamente consumidas pela população (BASTOS et al., 2007a; HECK; DE MEJIA, 2007; LORIA; BARRIOS; ZANETTI, 2009; BRACESCO et al., 2011; LARA; JUNIOR; MORAND, 2016). A erva-mate também pode ser encontrada em supermercados nos Estados Unidos e Europa em forma de chá energético, combinada ou não com outras ervas, com o objetivo de auxiliar na redução de peso (BRACESCO et al., 2011).

No Brasil, a ocorrência natural da erva-mate é na região sul, distribuindo-se também pelos estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais, sendo cultivada apenas na região sul (USDA, 2011). Nestas regiões, o mate possui grande importância socioeconômica por ser uma espécie arbórea que não sofre muito com alterações climáticas, quando comparadas aos cultivos agrícolas em geral. O cultivo da erva-mate é realizado por pequenos produtores rurais ou pelas próprias indústrias ervateiras (RESENDE et al., 2000; VIDOR et al., 2002).

O processamento das partes aéreas da erva-mate consiste de três etapas, compostas de “sapeco”, que é uma rápida secagem com exposição direta da erva às chamas, com o objetivo de inibir a atividade enzimática e reduzir o nível de umidade, uma “secagem rápida” realizada com um cilindro rotativo com exposição direta ao calor e à fumaça da queima de lenha ou em esteira com exposição ao ar quente, e o “cancheamento”, que consiste na trituração da matéria-prima (ESMELINDRO et al., 2002). Isolabella et al. (2010) demonstraram que

amostras obtidas após o processo de sapeco e secagem possuem maior teor de princípios biologicamente ativos, como os ácidos cafeoilquínicos e metilxantinas, do que as folhas verdes de erva-mate. Em contrapartida, outros pesquisadores ao avaliarem o teor de ácidos clorogênicos (ACGs) em amostras de erva-mate obtidas em diferentes etapas de processamento, demonstraram haver perda significativa desses compostos durante a torrefação, sugerindo que um preparo de extrato enriquecido nestes compostos possa ser utilizado pela indústria farmacêutica (BUTIUK et al., 2016).

Fatores como variação genética e respostas ambientais podem influenciar a quantidade dos compostos bioativos presentes nas folhas de erva-mate (NAKAMURA et al., 2009). Ao avaliar o teor de umidade e a eficiência da extração aquosa de substâncias bioativas da erva-mate foi observado que o processamento altera significativamente as quantidades de cafeína e ACGs através do aumento destes compostos após algumas extrações (BASTOS et al., 2006).

Na medicina popular, a erva-mate é utilizada para o tratamento de diversos distúrbios, como artrite, dor de cabeça, constipação, reumatismo, obesidade, fadiga e desordens hepáticas. Entretanto, o consumo do mate vem aumentando, principalmente, devido à divulgação dos seus benefícios à saúde, os quais são atribuídos aos compostos químicos, tais como metilxantinas – relacionadas ao estímulo do sistema nervoso central e do miocárdio, vasoconstrição periférica e relaxamento do músculo liso (KITATANI; WATANABE; SHIBUYA, 1993). Os compostos fenólicos – associados com as propriedades antioxidante, hipoglicêmica e hipocolesterolêmica (OHNISHI et al., 1994; MEYER; HEINONEN; FRANKEL, 1998), e saponinas – detentoras de efeitos anti-inflamatório, hipocolesterolêmico e antiparasitário (GOSMANN & GUILLAUME, 1994).

Nos últimos anos, diversos efeitos foram comprovados cientificamente, como propriedades antioxidante (GUGLIUCCI, 1996; DA SILVA et al., 2008; BOAVENTURA et al., 2012; FERNANDES et al., 2012; PRUDÊNCIO et al., 2012; PERES et al., 2013), antiglicação (GUGLIUCCI et al., 2009; PEREIRA et al., 2012), antiobesidade (JACOB, 2012; KANG et al., 2012; ARÇARI et al., 2013), anti-inflamatória (LANZETTI et al., 2008; JACOB, 2012; 2013; PIMENTEL et al., 2013), hipocolesterolêmica; (BOAVENTURA et al., 2012; KANG et al., 2012; DE MORAIS et al., 2009), antimicrobiana (BURRIS et al., 2011, 2012; MARTIN et al., 2013), antihiperglicêmica (KLEIN et al., 2011; JACOB, 2012; KANG et al., 2012), estimulante do



sistema nervoso central (VIEIRA et al., 2010) e vasorelaxante (BAISCH; URBAN; RUIZ, 2004; FELIPPI, 2005; GAO et al., 2013; SCHINELLA; FANTINELLI; MOSCA, 2005; STEIN et al., 1999).

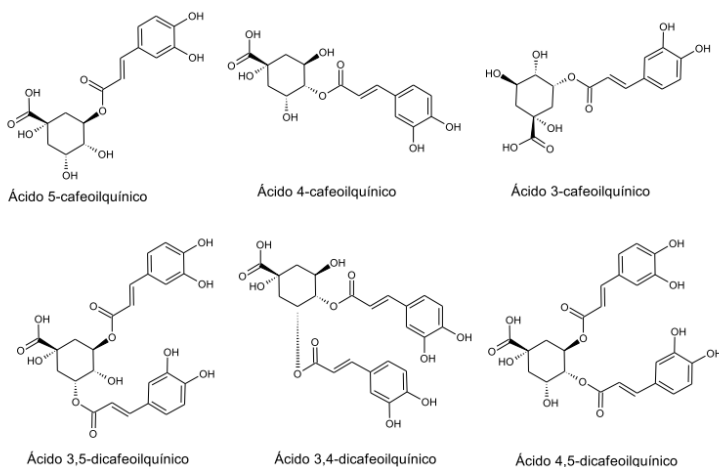
## 2.2 COMPOSTOS BIOATIVOS E ATIVIDADES BIOLÓGICAS ATRIBUÍDAS À ERVA-MATE

A *Ilex paraguariensis* apresenta inúmeros metabólitos secundários responsáveis por atividades biológicas, tanto nas folhas, quanto nos resíduos da planta (MAZZAFERA, 1997). Tais propriedades biológicas são atribuídas à presença de diversos compostos bioativos, como os compostos fenólicos, metilxantinas, e as saponinas (SPARG; LIGHT; VAN STADEN, 2004; BASTOS et al., 2007a; HECK; DE MEJIA, 2007).

Dentre os compostos fitoquímicos identificados no extrato de erva-mate, os principais são da classe dos ácidos fenólicos da família dos ACGs, ácido 3-cafeoilquínico (3-CQA); ácido 4-cafeoilquínico (4-CQA); ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA); ácido 3,4-dicafeoilquínico (3,4-diCQA); ácido 3,5-dicafeoilquínico (3,5-diCQA); ácido 4,5-dicafeoilquínico (4,5-diCQA) os quais se diferem pela substituição do anel aromático (Figura 1). Algumas das propriedades terapêuticas da erva-mate são atribuídas à grande quantidade dos derivados cafeoilquínicos, como o ácido cafeico e seus derivados que exibem propriedades antioxidantes. Esses compostos são bem distribuídos na planta na forma esterificada, dentre eles como ácido cafeico, ferúlico, sinápico e *p*-cumárico. Além disso, o mate contém flavonóides, aminoácidos, minerais (fósforo, ferro, potássio, manganês, magnésio, enxofre e cálcio), e vitaminas (C, B1 e B2) (FILIP et al., 2000; HEINRICHS; MALAVOLTA, 2001; BASTOS et al., 2007a; HECK; DE MEJIA, 2007; BRACESCO et al., 2011).

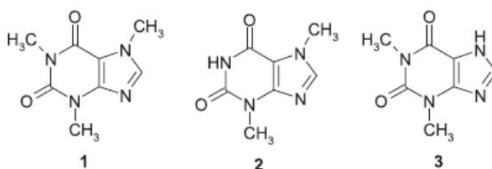
Os alcaloides purínicos (xantinas) são originários de bases purínicas e estão presentes em diversas espécies vegetais sendo que os principais encontrados na erva-mate são a cafeína (1,3,7-trimetilxantina) e a teobromina (3,7-dimetilxantina), e em menor quantidade a teofilina (1,3-dimetilxantina) (ATHAYDE; COELHO; SCHENKEL, 2000). Possivelmente isso se deve ao fato de a teofilina ser um intermediário no catabolismo da cafeína na planta (ITO; CROZIER; ASHIHARA, 1997). As estruturas químicas destes compostos estão representadas na Figura 2.

**Figura 1** – Estrutura química dos principais compostos fenólicos da erva-mate (OLIVEIRA, 2013).



A cafeína possui a característica de acelerar o metabolismo, desencadeando mecanismos de termogênese, saciedade e oxidação de gorduras, além de aumentar o consumo de oxigênio pelos tecidos. Além disto, a cafeína apresenta propriedades estimulante do sistema nervoso central e das atividades cardíaca, muscular e renal (BASTOS et al., 2007a; BELZA; TOUBRO; ASTRUP, 2009). A concentração de cafeína na erva-mate é semelhante àquela presente no café. Um copo de 150 mL de chimarrão contém 78 g de cafeína e a mesma quantidade de café apresenta em torno de 85 mg de cafeína (MAZZAFERA, 1997).

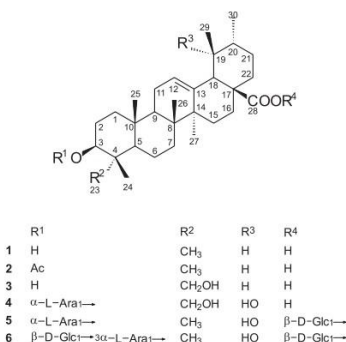
**Figura 2** – Estrutura química das metilxantinas: (GNOATTO; SCHENKEL; BASSANI, 2005).



1) cafeína; 2) teobromina; 3) teofilina

O gosto amargo característico do mate é atribuído à presença das saponinas. As saponinas são substâncias altamente hidrossolúveis e formadas por vários grupamentos glicosídicos encontrados em plantas superiores, com propriedades de rompimento de membranas e formação de complexos com esteroides e ácidos biliares (GOSMANN et al., 1995; KRAEMER et al., 1996; FERREIRA et al., 1997). Várias saponinas triterpênicas contendo ácido ursólico foram isoladas das folhas do mate (Figura 3). Diversas atividades biológicas são atribuídas às saponinas, tais como atividade anti-hipercolesterolêmica, hipolipêmica, anti-trombótica, antiviral, antibacteriana e antifúngica (FERREIRA et al., 1997; DAHMER et al., 2012; LÜCKEMEYER et al., 2012; RESENDE et al., 2012).

**Figura 3** - Estrutura química básica de saponinas isoladas de *Ilex paraguariensis* derivadas do ácido ursólico (TAKETA; BREITMAIER; SCHENKEL, 2004).



## 2.3 COMPOSTOS FENÓLICOS

Compostos bioativos, em geral, compreendem uma grande variedade de classes de compostos químicos com diferentes propriedades físico-químicas (polaridade, solubilidade, capacidade de formar pontes de hidrogênio, potencial de oxi-redução) que determinarão a eficiência da atividade e o meio que poderá atuar. Tais compostos podem ser provenientes de produtos de origem animal (ácido graxo da família ômega 3, ácidos graxos conjugados), vegetal (carotenoides, fitoesteróis, terpenos, compostos fenólicos) ou micro-organismos (DE OLIVEIRA; BASTOS, 2011).

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários de plantas atuando em seu crescimento, desenvolvimento, proteção e atração de agentes polinizadores e são amplamente encontrados em alimentos como frutas, vegetais, cereais e legumes, e em bebidas de origem vegetal, como vinho, café e chá mate. Tais substâncias constituem um grupo de aproximadamente dez mil compostos diferentes e esses compostos podem ser agrupados em diferentes subclasses de acordo com a sua estrutura, que é formada por um anel aromático ligado a um ou mais grupos hidroxila. Assim, os compostos fenólicos são diferenciados de acordo com a forma em que um grupo fenol está disposto e a sua quantidade (SCALBERT; WILLIAMSON, 2000; MANACH et al., 2004; CHEYNIER, 2005; FARAH; DONANGELO, 2006; HECK; DE MEJIA, 2007).

Os compostos fenólicos são considerados essenciais para a manutenção da saúde, pois modulam a defesa antioxidante e são responsáveis pela proteção frente a processos inflamatórios e mutagênicos, sendo que a ingestão insuficiente dos mesmos constitui componente de risco para doenças crônicas não transmissíveis, como aterosclerose, doenças cardiovasculares, resistência à insulina, diabetes *mellitus* tipo 2, síndrome metabólica, hipertensão e alguns tipos de câncer (SORG, 2004; SOUSA et al., 2007; BASTOS; ROGERO; ARÊAS, 2009; CROWE et al., 2011; SATO et al., 2011; DEL RIO et al., 2013).

Os antioxidantes são um grupo de substâncias que, quando presentes em concentrações ideais em relação aos substratos oxidáveis, inibem ou atrasam significativamente os processos oxidativos. O desequilíbrio entre a taxa de produção de agentes oxidantes e sua degradação desencadeia o estresse oxidativo (VAYA; AVIRAM, 2001)

Inicialmente acreditava-se que os antioxidantes presentes nos alimentos diminuam a atividade antioxidante endógena, possivelmente por mecanismos de *feedback* de inibição. No entanto, atualmente acredita-se que os compostos fenólicos estimulam o sistema de proteção antioxidante endógeno, conferindo proteção celular e tecidual (FORMAN; DAVIES; URSINI, 2014).

Em consequência disso, nos últimos anos houve grande aumento na investigação da ocorrência desses compostos em alimentos, devido aos efeitos benéficos dos mesmos à saúde humana, entretanto, são pouco conhecidas as formas bioativas *in vivo* e os mecanismos pelos quais eles podem contribuir para a prevenção de doenças (HELENO et al., 2015).

Sabe-se que os compostos fenólicos afetam diversos processos fisiológicos e fisiopatológicos, mas a sua natureza é desconhecida, tornando importante a determinação dos compostos fenólicos e seus metabólitos que efetivamente alcançam os tecidos-alvos, os quais podem estar de fato exercendo a ação esperada (GONTHIER et al., 2003).

## 2.4 ÁCIDOS FENÓLICOS

Os ácidos fenólicos são considerados um grupo dentro da família dos compostos fenólicos (CREMIN; KASIM-KARAKAS; WATERHOUSE, 2001). Ácidos fenólicos estão presentes em quase todos os alimentos derivados de plantas, o que representa uma porção significativa da dieta humana. O consumo médio dos ácidos fenólicos em seres humanos é de, aproximadamente 1 g/dia, sendo ~60% constituído por ácidos fenólicos e ~40% referente a flavonoides e flavonas, dependendo dos hábitos dietéticos e preferências de cada indivíduo (KOCH et al., 2015).

A classe desses compostos pode ser dividida em derivados do ácido benzóico e derivados do ácido cinâmico, sendo os ácidos hidroxinâmicos os mais comuns. O principal representante da família do ácido hidroxicinâmico é o ácido cafeico, que ocorre nas plantas principalmente em sua forma esterificada, como por exemplo, o ACG. Os derivados hidroxicinâmicos e hidroxibenzóicos estão raramente presentes nas plantas em sua forma livre. Frequentemente eles ocorrem na forma de ésteres e glicosídeos, sendo as moléculas livres (agliconas) liberadas por hidrólise ácida, alcalina ou enzimática (ROMMEL; WROLSTAD, 1993; MANACH et al., 2004).

A presença dos ácidos fenólicos nas folhas de erva-mate é conhecida desde 1935, quando Woodard e Cowland (*apud* Alikardis 1987) descreveram a presença de uma substância então chamada de “coffetannin” que, quando hidrolisada resultava em ácido cafeico (ALIKARIDIS, 1987). Os principais ácidos fenólicos presentes na erva-mate são os ácidos mono e dicafeoilquínicos, pertencente ao grupo dos ACGs, caracterizados pela ligação éster entre o ácido quínico e uma ou mais moléculas de ácidos hidroxinâmicos, como pode ser observado na Figura 1 (BASTOS et al., 2007b).

## 2.5 ÁCIDOS CLOROGÊNICOS (ACGs)

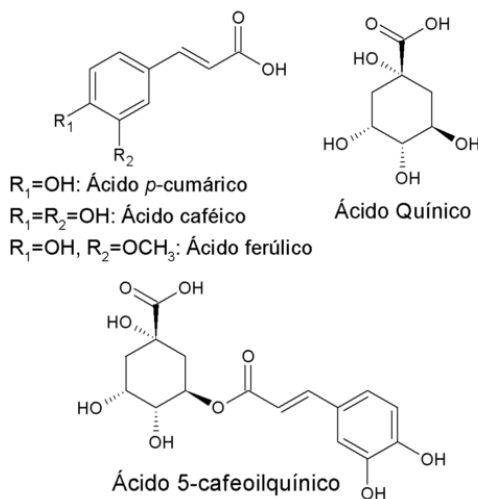
O termo ACG parece ter sido introduzido em 1846 para designar um composto fenólico com função ácida de estrutura desconhecida na época, que conferia cor verde ao meio aquoso levemente alcalino e exposto ao ar. Em 1901 este ácido foi isolado e denominado clorogenato de cafeína, a partir do qual se preparou um ácido puro. A estrutura química para este composto foi estabelecida por Fisher como ácido 3-cafeoilquínico (atualmente conhecido como 5-cafeoilquínico). Mais tarde, outros compostos fenólicos foram isolados, caracterizados quanto à sua estrutura química e agrupados na mesma família (CLIFFORD et al., 2003; BASTOS DE MARIA; MOREIRA, 2004).

Os ACGs são compostos fenólicos solúveis em água formados pela esterificação de ácidos *trans*-cinâmicos, como ácidos cafeico, ferúlico e do *p*-cumárico com o ácido quínico (CLIFFORD, 1989; BASTOS et al., 2007b). As fórmulas estruturais dos principais ácidos hidroxinâmicos, ácido quínico e 5-CQA estão representadas na Figura 4.

O ACG é o éster que mais possui estudos sobre sua bioatividade. Durante as últimas décadas, os resultados de estudos *in vitro* e *in vivo* levaram os pesquisadores a atribuir diferentes funções farmacológicas aos ACG, como atividades antibacteriana, antioxidante e anticarcinogênica, além de apresentarem efeitos hipolipêmico e hipoglicemiante (KISS, 1989; KONO et al., 1997; GUGLIUCCI et al., 2009; PARI; KARTHIKESAN; MENON, 2010; PUANGPRAPHANT et al., 2011; SATO et al., 2011; ONG; HSU; TAN, 2013; PENG et al., 2015).

Assim como ocorre com compostos fenólicos em geral, os metabólitos que de fato alcançam as células e tecidos, após a ingestão de ACGs, podem ser química, biológica e funcionalmente distintos dos compostos precursores (KROON et al., 2004; CROZIER; DEL RIO; CLIFFORD, 2010).

**Figura 4** – Estrutura química do 5-CQA e dos ácidos que compõem os ácidos clorogênicos (DE OLIVEIRA; BASTOS, 2011).



### 2.5.1 Absorção e biodisponibilidade dos ácidos clorogênicos

Os compostos fenólicos são os mais comuns na dieta humana, porém, não são os constituintes mais ativos, possivelmente pela baixa atividade intrínseca, baixa absorção intestinal, por serem altamente metabolizados ou rapidamente eliminados do organismo (MANACH et al., 2004). Assim, faz-se necessário quantificar e avaliar as formas químicas dos compostos fenólicos, provenientes da alimentação, que são encontrados no organismo após a ingestão. Nesse contexto, um aspecto importante a ser considerado ao se estudar o papel dos compostos fenólicos na saúde humana é a avaliação da sua biodisponibilidade no plasma e tecidos (STALMACH et al., 2009).

Biodisponibilidade é um termo da farmacologia que define a fração da dose administrada de uma substância que atinge a circulação sistêmica e a velocidade com que este processo ocorre (MORAIS & LOBATO, 2010).

As pesquisas a respeito da absorção e biodisponibilidade dos compostos fenólicos contribuem para o aumento do conhecimento acerca da absorção, metabolização, distribuição e excreção desses compostos, e elas vêm demonstrando que os metabólitos formados no

organismo têm grande variabilidade para diferentes classes de compostos fenólicos (CROZIER; DEL RIO; CLIFFORD, 2010).

Os flavonoides, em especial a quercetina, as catequinas e as isoflavonas compõem os compostos fenólicos cujas informações sobre absorção e metabolismo são mais abundantes na literatura (WILLIAMSON; MANACH, 2005; SCHOLZ; WILLIAMSON, 2007; DA SILVA et al., 2008; PANZA et al., 2008; CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009)

Os polifenóis que circulam na corrente sanguínea são derivados conjugados e amplamente ligados à albumina. De forma geral, os ácidos fenólicos são secretados através da via biliar no duodeno, onde são expostos à ação de enzimas bacterianas, especialmente a  $\beta$ -glicuronidase e a sulfatase. Após esse processo, os ácidos fenólicos podem ser reabsorvidos, o que pode aumentar a presença desses ácidos no organismo (MANACH et al., 2004)

Durante a absorção, os ácidos fenólicos são conjugados no intestino delgado, posteriormente no fígado, onde ocorrem os processos de metilação, sulfatação e glicuronidação (MANACH et al., 2004). Essas biotransformações representam um processo metabólico de detoxificação, por aumentarem a hidrofiliabilidade dos compostos facilitando a eliminação biliar e urinária (D'ARCHIVIO et al., 2007). Além disto, estes mecanismos são eficientes, pois têm se observado baixas concentrações de agliconas no sangue após o consumo de polifenóis (HELENO et al., 2015).

De forma geral, os compostos fenólicos começam a ser absorvidos no estômago e intestino delgado, seguindo para o cólon, onde são metabolizados pela microbiota (ZAMORA-ROS; LLORACH; ANDRES-LACUEVA, 2012). A microbiota do intestino grosso exerce papel importante no metabolismo dos ACGs e de ácidos fenólicos em geral. Após a clivagem da ligação éster, os ácidos livres podem seguir duas vias metabólicas: *i*) são absorvidos pela mucosa intestinal e passam para a corrente sanguínea (na forma livre ou após conjugação por enzimas) ou; *ii*) permanecem no intestino grosso e sofrem metabolização adicional pela microbiota (WILLIAMSON; MANACH, 2005).

No organismo, os compostos fenólicos são submetidos a diversas biotransformações comuns do metabolismo de xenobióticos: oxidação, redução e hidrólise por enzimas de fase I, tais como aquelas do sistema citocromo P450, glicosidases e esterases, além da conjugação



por enzimas de fase II (glicuronização pelas UDP-glicuroniltransferases – COMT) (RECHNER et al., 2004; MATEOS; GOYA; BRAVO, 2006).

No que diz respeito a estudos sobre absorção direta dos ACGs, as primeiras evidências foram obtidas por meio da quantificação das concentrações plasmáticas e/ou urinárias após o consumo de alimentos com quantidades conhecidas de ACGs, como tomate cereja, brócolis, saladas de folhas, suco de uva, dentre outros (RECHNER et al., 2002) ou da suplementação com os compostos isolados (AZUMA et al., 2000).

Os ácidos fenólicos caracterizam-se por ter um anel aromático, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos hidroxila (SOARES, 2002). Enquanto a sulfatação pode ocorrer apenas no grupo hidroxila do ácido fenólico, a glicuronidação pode ocorrer tanto no grupo hidroxila quanto no grupo carboxílico. Acredita-se que a sulfatação e glicuronidação de polifenóis diminuem a atividade antioxidante dos compostos fenólicos, pois em ambos ocorrem a redução dos grupos hidroxila da estrutura fenólica, os quais são atribuídas as principais funções das propriedades antioxidantes dos polifenóis. Entretanto, ao avaliar tais propriedades de metabólitos glicuronados sintetizados a partir do ácido cafeico e ferúlico, verificou-se que alguns destes, apresentaram elevada atividade quando comparada a seus precursores fenólicos (PIAZZON et al., 2012).

Foram identificados metabólitos microbianos do ACG (ácido m-cumárico, derivados fenilpropionico, benzoico e ácido hipúrico) em plasma e urina de ratos que tiveram dieta suplementada com ACG, ácido cafeico e ácido quínico, sugerindo que grande parte do metabolismo do ACG depende da microbiota intestinal (GONTHIER et al., 2003).

Alguns trabalhos sobre a biodisponibilidade de ACGs foram realizados com café, considerado a principal fonte desses compostos na dieta ocidental (CLIFFORD, 1999; MONTEIRO et al., 2006, 2007; FARAH et al., 2008; RENOUF et al., 2014; STALMACH; WILLIAMSON; CROZIER, 2014). Porém, os dados ainda são considerados escassos e, muitas vezes, contraditórios (WILLIAMSON; DIONISI; RENOUF, 2011).

A determinação de ACG e ácido cafeico foi realizada em indivíduos ileostomizados após a ingestão de uma bebida com quantidades conhecidas desses compostos. Foram analisados o fluido da ileostomia e a urina por 24 h. Os resultados mostraram que 95% do ácido cafeico e 33% ACG foram absorvidos no intestino delgado e atingiram a circulação e pequenas quantidades destes compostos foram encontradas na urina, provavelmente porque são metabolizados em

outros compostos após a absorção (OLTHOF; HOLLMAN; KATAN, 2001). Em outro estudo do mesmo grupo, porém com indivíduos saudáveis, foi observado que 1,7% de 2g de 5-CQA estavam presentes na urina, o ácido hipúrico representou 50% dos metabólitos formados, sugerindo que metade do ACGs ingeridos foram metabolizados em ácido hipúrico (OLTHOF et al., 2003).

Ao analisar o perfil dos ACGs e seus isômeros em plasma e urina de indivíduos saudáveis após o consumo agudo de café, observou-se que esses compostos foram diferentemente absorvidos e metabolizados, pois foram encontrados seis metabólitos intactos dos ACGs no plasma, sendo que esses metabólitos não foram identificados na urina, concluindo que a urina não é uma importante via de excreção para os mesmos (MONTEIRO et al., 2007). Resultados semelhantes foram publicados por Farah et al. (2008), que avaliaram a biodisponibilidade de um extrato de café com alto teor de ACGs e observaram que esses compostos foram absorvidos no organismo humano pelo trato gastrointestinal e uma pequena quantidade excretada na urina.

Existem poucos estudos que avaliaram a biodisponibilidade dos constituintes da erva-mate. Em ratos *Wistar*, a administração de chá mate por gavagem demonstrou que a absorção dos ACGs começou no estômago, porém, a maior parte foi absorvida no intestino grosso, principalmente após a metabolização por bactérias (OLIVEIRA, 2013). Em outro estudo publicado recentemente, avaliou-se a biodisponibilidade de polifenóis de *Ilex paraguariensis* em seres humanos através da determinação de fenóis totais no plasma, após a ingestão de 300 mL de infusão de erva-mate. A atividade antioxidante no plasma também foi determinada. Com base nos resultados, aproximadamente 49% dos compostos fenólicos do mate foram absorvidos. O aumento da atividade antioxidante no plasma foi proporcional ao aumento da concentração plasmática de fenóis totais (BOADO; FRETES; BRUMOVSKY, 2015). Porém, mesmo com os avanços recentes, não existe ainda consenso sobre a biodisponibilidade dos ACGs, assim como uma relação entre a porcentagem da quantidade ingerida que efetivamente é absorvida e metabolizada, principalmente pela falta de dados sobre seus metabólitos (OLIVEIRA, 2013).

Considerando que após a absorção dos ACGs são gerados metabólitos que podem ter diferentes atividades do composto original, destaca-se a importância de investigar a absorção e metabolização dos ácidos fenólicos após a ingestão da erva-mate, visto que os estudos

acerca do assunto ainda são escassos. O conhecimento detalhado a respeito da conjugação, metabolização e de concentrações plasmáticas de ACGs resultantes da ingestão de erva-mate justificaria as propriedades benéficas atribuídas a tais compostos.



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Detectar e quantificar os metabólitos dos ACGs e metilxantinas no plasma e na urina de indivíduos saudáveis após a ingestão aguda de extrato nebulizado padronizado de erva-mate (*Ilex paraguariensis*, A. St.-Hil.).

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar o teor de compostos fenólicos, metilxantinas, fenóis totais e saponinas totais no extrato nebulizado padronizado de erva-mate verde e tostada;
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos de erva-mate verde e tostada;
- Otimizar o método cromatográfico para a detecção de 15 compostos simultaneamente;
- Identificar e quantificar os metabólitos do ACG e metilxantinas presentes no plasma após ingestão aguda do extrato de erva-mate;
- Identificar e quantificar os metabólitos do ACG e metilxantinas presentes na urina após ingestão aguda do extrato de erva-mate.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 EQUIPAMENTOS, MATERIAIS E REAGENTES

O extrato nebulizado padronizado de erva-mate (ENPEM) foi obtido na empresa DOMANI Produtos Naturais - Pato Bragado/PR, a partir de folhas de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., coletadas em cultivos de plantas adultas de populações de erva-mate cultivadas na localidade de Ivaí-PR de teste de procedência e progênie pertencente ao programa de melhoramento da erva-mate da EMBRAPA-Florestas. As plantas foram selecionadas a partir de informações prévias sobre características como produção de massa foliar e do teor de componentes químicos (CARDOZO et al., 2007; NAKAMURA et al., 2009).

As análises realizadas por cromatografia líquida foram realizadas em equipamento com injetor manual, conectado ao degaseificador DGU 20A5 com integrador CBM 20A, detector ultravioleta-visível (UV-Vis) e de arranjo de diodos (DAD) SPDMS-20A, bomba LC-20AD, controlado pelo software LC Solution 1.2 (Schimadzu, Kyoto, Japão). Todas as amostras injetadas, assim como as fases móveis empregadas, foram filtradas em membranas adquiridas da Millipore (EUA).

Para as análises dos parâmetros bioquímicos séricos, como ureia, transaminases, fosfatase alcalina, creatina quinase, perfil lipídico, glicose e ácido úrico e a creatinina em urina, utilizou-se o analisador automatizado Dimension<sup>®</sup> RxL da Siemens Healthcare Diagnostics Inc. (Deefield, IL, EUA). Para a realização de hematócrito e hemograma, foi utilizado o analisador hematológico automatizado Sysmex XE-2100D (Sysmex Corporation, Inc. Kobe, Japão).

Os reagentes relacionados a seguir foram adquiridos da Sigma Aldrich (Steinheim, Alemanha ou St. Louis, EUA): reagente de Folin-Ciocalteu, 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico (Trolox), 2,4,6-Tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ), acetato de sódio, ácido cítrico, gálico, cafeico, 3-cafeoilquínico (3-CQA), 4-cafeoilquínico (4-CQA), 5-cafeoilquínico (5-CQA), 3,4-dicafeoilquínico (3,4-diCQA), 3,5-dicafeoilquínico (3,5-diCQA), 4,5-dicafeoilquínico (4,5-diCQA), hipúrico, ferúlico, vanílico, dihidrocafeico, *p*-cumárico, cafeico, ursólico, oleanólico, teobromina, cafeína e enzima  $\beta$ -glicuronidase tipo HP-2 de *Helix pomatia* com atividade de 100000 U/mL de glicuronidase e 2000 U/mL de sulfatase.

Ácido acético glacial, etanol, acetato de sódio e cloreto férrico foram obtidos da empresa Labsynth (Diadema, SP). O metanol grau

HPLC foi adquirido da empresa Tedia Co. (Phoenix, AZ, Estados Unidos). Vanilina, ácido clorídrico, clorofórmio, peróxido de hidrogênio e fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) foram adquiridos da empresa VETEC (Rio de Janeiro, RJ). Ácido perclórico, fosfato de sódio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) e demais reagentes foram adquiridos de outras marcas nacionais. Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura (Milli-Q Direct-Q 3 UV-R, Millipore - Billerica, MA, Estados Unidos), com sais de pureza analítica.

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO NEBULIZADO PADRONIZADO DE ERVA-MATE VERDE E TOSTADA

#### 4.2.1.1 Obtenção do extrato de erva-mate

As folhas de erva-mate passaram pelo processo de sapeco e secagem em esteira com temperatura controlada entre 90 a 100 °C, sendo, posteriormente trituradas e submetidas ao processo de extração em tanque com solvente aquoso aquecido a 82 °C (1:10 m/v), durante 40 min sob agitação. Ao fim da extração o produto foi centrifugado, a fim de promover a separação do resíduo sólido e líquido. Em seguida, foi realizada a concentração do extrato (Aparelho Concentrador Evaporador Multi - Tubular Mod. JAA-INC 220 – Incal Máquinas) a 40 °C e pressão negativa - 680 mmHg durante 6 horas. Por fim, o produto passou pelo processo de secagem em spray dryer (Mod. SD-250 - REMID) com temperatura de entrada de 240 °C e saída 60 °C. Ao final deste processo o extrato foi embalado e armazenado para a realização do estudo.

#### 4.2.1.2 Medida colorimétrica de fenóis totais do extrato nebulizado de erva-mate

O teor de fenóis totais na infusão do ENPEM verde e tostada foi determinado pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu segundo metodologia descrita por Singleton et al. (1999). Cinquenta microlitros do extrato aquoso de erva-mate foram misturados com 150 µL de etanol (95%), 800 µL de água destilada e 80 µL do reagente de Folin-Ciocalteu (50%). Após 5 min, foi adicionado 150 µL de bicarbonato de sódio 5% e a mistura permaneceu à temperatura ambiente por 1 h, na



ausência de luz. A leitura da absorbância do produto colorido foi realizada em comprimento de onda de 765 nm (espectrofotômetro Spectrum SP2000 - Xangai, China). O ácido clorogênico foi utilizado como padrão e as análises foram realizadas em triplicata.

#### 4.2.1.3 Quantificação da capacidade antioxidante total no ENPEM verde e tostada

##### 4.2.1.3.1 Potencial antioxidante redutor de ferro (FRAP)

A capacidade antioxidante total foi verificada por meio do ensaio FRAP (do inglês, *Ferric Reducing Antioxidant Potential*), o qual se baseia no potencial redutor férrico de compostos antioxidantes presentes no extrato. Neste método, os antioxidantes reduzem o  $\text{Fe}^{+3}$  a  $\text{Fe}^{+2}$ , o qual é quelado pela 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) para formar o complexo  $\text{Fe}^{+2}$ -TPTZ, com absorção máxima em 593 nm (BENZIE; STRAIN, 1996). Resumidamente, 10  $\mu\text{L}$  do extrato aquoso de mate foram adicionados a 1 mL da solução de trabalho, que continha cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ), TPTZ e tampão acetato de sódio. A mistura foi incubada por 15 min. a 37 °C e, posteriormente, realizou-se a leitura da absorbância do produto colorido em 593 nm em espectrofotômetro semiautomatizado (Bioplus BIO 2000 – Barueri, SP). A concentração da capacidade antioxidante foi calculada a partir da curva padrão preparada com diferentes concentrações de Trolox, um análogo hidrossolúvel da vitamina E, e os resultados foram expressos em  $\mu\text{M}$  equivalentes Trolox. As análises foram realizadas em triplicata de três infusões de extrato seco de erva-mate verde e tostada.

##### 4.2.1.3.2 Capacidade antioxidante total (TAC)

O método se baseia na habilidade dos antioxidantes presentes no extrato de erva-mate de bloquearem (“*quench*”) o cátion radical estável ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenz-thiazoline-6-sulfonic) diammonium salt), um cromóforo azul-esverdeado com absorção máxima em 660 nm (maior concentração de analito na amostra), em comparação com a capacidade antioxidante do Trolox. A solução de ABTS foi preparada em peróxido de hidrogênio 2,0 mM em meio ácido. A adição de antioxidantes ao cátion radical pré-formado reduz o radical a ABTS com consequente descoloração da solução. Após a adição de 5  $\mu\text{L}$  do ENPEM ou de Trolox em 20  $\mu\text{L}$  da solução de ABTS e 200  $\mu\text{L}$  de

tampão acetato 0,4 M, a absorbância foi medida imediatamente após a sua homogeneização em um leitor de microplacas (Epoch (Biotek Instruments, Winooski, VT, EUA) (adaptado de PELLEGRINI, 1999; 2001; EREL, 2004; BOTSOGLOU, 2008).

#### 4.2.1.4 Quantificação das saponinas totais nos extratos nebulizados de erva-mate verde e tostada

##### 4.2.1.4.1 Método espectrofotométrico

A quantificação das saponinas totais foi realizada pelo método espectrofotométrico, conforme extração descrita por Gnoatto et al. (2005) e reação com vanilina e ácido perclórico descrita por Fan e He (2006). As saponinas contidas em 10 mL dos extratos aquosos de erva-mate verde e tostado foram submetidas à hidrólise com 5 mL de HCl 12 N, durante 2 h sob refluxo. As sapogeninas foram extraídas com 6 mL de clorofórmio, e o processo foi repetido quatro vezes. As frações clorofórmicas foram combinadas e evaporadas em evaporador rotativo e o resíduo foi resuspenso em 10 mL de etanol. Para a quantificação, alíquotas da solução etanólica foram evaporadas e 150 µL de vanilina a 5%, preparada em ácido acético glacial, e 500 µL de ácido perclórico foram adicionados sobre o resíduo seco. A mistura foi incubada a 60 °C por 45 min. Após resfriamento em banho de gelo, foi adicionado ácido acético glacial e a absorbância foi lida em 548 nm (espectrofotômetro Spectrum SP2000 – Xangai, China). Como padrão foi utilizado o ácido ursólico, núcleo triterpênico majoritário nas saponinas de *Ilex paraguariensis* (GNOATTO; SCHENKEL; BASSANI, 2005).

##### 4.2.1.4.2 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A quantificação das saponinas totais por CLAE foi realizada seguindo a hidrólise ácida do ENPEM verde e tostada com ácido clorídrico sob refluxo. Um mililitro do extrato metanólico foi diluído, filtrado em membrana de 0,45 µm (Millipore, HVHP) e analisado por CLAE em triplicata de três amostras distintas. A análise das saponinas totais foi realizada em coluna de fase reversa Shimpack C18 (4,6 mm x 250 mm, 5 µm) e pré-coluna Shimpack C18 (4 mm x 10 mm, 5µm). A fase móvel consistiu da mistura isocrática de metanol:ácido fórmico 0,1% (86:14, v/v) utilizando fluxo de 1,0 mL/min e comprimento de onda de 203 nm à temperatura ambiente. Como padrão, foi utilizado o

ácido ursólico, dissolvido em metanol (GNOATTO; SCHENKEL; BASSANI, 2005).

#### 4.2.1.5 Quantificação dos compostos fenólicos e metilxantinas no extrato nebulizado de erva-mate verde por CLAE

As análises do perfil de compostos fenólicos e metilxantinas do extrato nebulizado de erva-mate foram realizadas por CLAE (FARAH et al., 2005), segundo as condições descritas no item 4.2.5. O extrato aquoso foi preparado em triplicata, com concentração final de 1 mg/mL (m/v). Alíquotas de 1 mL foram filtradas com membrana (0,45 µm) e 20 µL foram injetados em coluna cromatográfica. A detecção de compostos fenólicos foi monitorada a 325 e de metilxantinas em 280 nm. A identificação dos compostos foi realizada por comparação dos tempos de retenção com seus respectivos padrões e a quantificação foi calculada empregando-se a equação da reta obtida pela regressão linear das curvas analíticas dos respectivos padrões.

### 4.2.2 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS ANALÍTICOS

Para avaliar a precisão e repetibilidade do método, os quais são utilizados como indicativo da capacidade de reprodução dos resultados obtidos foram analisadas cinco replicatas das amostras do extrato de erva-mate em CLAE, em dois dias consecutivos, totalizando 15 injeções. A partir do desvio padrão calculou-se a variação dos resultados das análises intra e inter-dia.

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados com base nos parâmetros das curvas de calibração dos ácidos cafeoilquínicos e dicafeiolquínicos, e da cafeína e teobromina, sendo os resultados obtidos após as análises serem realizadas em triplicata, conforme metodologia proposta pela ICH (2005):  $LD = 3,3 \cdot (s/S)$  e  $LQ = 10 \cdot (s/S)$ , sendo  $s$  o desvio padrão residual da equação de regressão e  $S$  o coeficiente angular.

A avaliação de estabilidade foi realizada através da análise dos ácidos fenólicos presentes em amostras de plasma coletadas de três indivíduos após 1 h da ingestão da erva-mate. As amostras foram analisadas no mesmo dia (controle), sendo o preparo realizado logo após a coleta do sangue, após 24 h e sete dias, sendo estas, armazenadas a -80 °C.

A recuperação do método de extração dos ACG em alíquotas de plasma foi avaliada através da adição de quantidades conhecidas dos três

isômeros do ácido cafeoilquínico em amostras que não continham estes compostos.

#### **4.2.3 PREPARO DA BEBIDA DE ERVA-MATE**

A bebida foi preparada pela adição de 300 mL de água em 40 g de extrato de erva-mate, totalizando a concentração de 15 mg/mL conforme a preparação utilizada em estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa (KLEIN et al., 2011; BOAVENTURA et al., 2012) e normalmente consumida pela população.

#### **4.2.4 ESTUDO *IN VIVO***

##### **4.2.4.1 Caracterização do estudo**

A pesquisa caracteriza-se como ensaio clínico de ingestão aguda, com coletas sanguíneas em tempo basal e após 1, 1,5, 2, 3 e 4 horas da ingestão. O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Lipídios, Antioxidantes e Aterosclerose e Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário (HU) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

##### **4.2.4.2 Aspectos éticos**

Os participantes foram convidados a participar do estudo sem qualquer constrangimento e, mediante aceitação voluntária, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (ANEXO A), segundo resolução do Conselho Nacional de Saúde, nº 466, de 2012 (BRASIL, 2012). Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética com pesquisas em seres humanos da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), sendo aprovado sob o número 39469014.3.0000.0118.

##### **4.2.4.3 Caracterização do grupo de estudo**

Para a caracterização dos participantes, foi aplicado um questionário para obtenção de informações sobre idade, peso, altura, e informações sobre a saúde dos mesmos (APÊNDICE A). As medidas de peso e estatura foram utilizadas para o cálculo do índice de massa

corporal (IMC), onde o peso, expresso em quilogramas (kg), é dividido pela estatura ao quadrado em metros.

#### 4.2.4.4 Monitoramento do estado de saúde dos participantes

Além do questionário clínico, antes do início do estudo foram realizados exames laboratoriais bioquímicos e hematológicos para a garantia do estado de saúde adequado ao estudo. As amostras foram analisadas no Serviço de Análises Clínicas do HU. No plasma, foram avaliados os parâmetros bioquímicos ureia e creatinina, transaminases, fosfatase alcalina, creatina quinase, perfil lipídico, glicose e ácido úrico e creatinina urinária em analisador automatizado Dimension® RxL da Siemens Healthcare Diagnostics Inc. (Deefield, IL, EUA). No sangue, foi avaliado o hemograma completo, incluindo o hematócrito. Para a realização de hematócrito e hemograma dos voluntários, foi utilizado o analisador hematológico automatizado Sysmex XE-2100D (Sysmex Corporation, Inc. Kobe, Japão).

#### 4.2.4.5 Protocolo experimental para o estudo *in vivo*

Os participantes recrutados eram membros da comunidade da Universidade Federal de Santa Catarina, sendo alunos matriculados nos cursos de graduação ou pós-graduação, que atenderam aos seguintes fatores de inclusão: não fumar, não ser usuário de bebidas alcoólicas, não ser usuário de suplementos vitamínicos e não ser portador de quaisquer desordens patológicas, incluindo processos infecciosos ou inflamatórios. Este estudo foi composto por oito voluntários saudáveis, três homens e cinco mulheres, com idade entre 21 e 28 anos.

Para melhor observar a absorção dos compostos fenólicos após o consumo agudo de erva-mate os participantes foram orientados verbalmente e por escrito (APENDICE B) a manter uma dieta pobre em ácidos hidroxycinâmicos por 24 h, evitando particularmente o consumo de café, frutas e sucos. Além disto, os participantes foram orientados a fazer um jejum de 12 h antes do estudo. Na manhã seguinte, os voluntários ingeriram 300 mL da bebida de erva-mate (15 mg/mL), e as coletas de sangue foram realizadas em tubos contendo heparina antes e 1, 1,5, 2, 3, e 4 h após o consumo. O sangue foi imediatamente centrifugado (750 x g, 10 min, 4 °C). A coleta de urina foi realizada antes e nos intervalos de 0-2 e de 2-4 h em recipiente apropriado. As amostras foram acidificadas com HCl 3 N, congeladas imediatamente

em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C até análise. O consumo de água foi liberado e 2 h após a ingestão da erva-mate os voluntários consumiram um lanche padronizado, composto de pão branco e presunto (MONTEIRO et al., 2007).

#### 4.2.4.6 Detecção de ácidos fenólicos por CLAE

Foi realizado ensaio clínico com o objetivo de analisar a biotransformação dos ácidos fenólicos presentes no ENPEM verde e seus possíveis metabólitos, os quais foram detectados por CLAE no plasma e na urina de indivíduos saudáveis.

Pesquisou-se nas amostras biológicas os principais ácidos clorogênicos encontrados no extrato de erva-mate (CQA e diCQA) e os compostos que poderiam ser formados após metabolização dos mesmos por enzimas endógenas de fase I e II (metabólitos primários) – cafeico, ferúlico, e derivados glicuronados e/ou sulfatados – ou enzimas provenientes da microbiota intestinal (metabólitos secundários) – ácidos *p*-cumárico, hipúrico, hidroxibenzóico, dihidrocafeico e vanílico (GONTHIER et al., 2003; LAFAY et al., 2006; FARAH et al., 2008; STALMACH et al., 2009).

##### 4.2.4.6.1 Extração dos ácidos clorogênicos do plasma

Após o descongelamento, a amostra de plasma teve seu pH ajustado para 5, foi desproteïnizada pela adição de etanol e vortexada. A amostra foi centrifugada a 17.500 x g; 5 min a 4 °C. O sedimento proteico foi resuspenso por duas vezes em etanol e recentrifugado nas mesmas condições. A mistura das fases etanólicas foi evaporada através de uma centrifugação acoplada a uma bomba de vácuo (Centrifuge for Vacuum Concentrator – SCANVAC) por aproximadamente 1 hora a 65°C e o resíduo foi resuspendido em tampão acetato de sódio 0,5 M contendo 2g/L de ácido ascórbico. Uma alíquota foi incubada com 10 µl da enzima β-glicuronidase (1.000 UI) e sulfatase (29 UI) por 2 h a 37 °C, e a outra alíquota foi analisada sem o tratamento enzimático (MONTEIRO et al., 2007). A utilização desta enzima tem como objetivo quantificar as formas livres e conjugadas dos ACGs e seus metabólitos. Ambas as alíquotas foram acidificadas com uma solução de HCl 3 N/metanol 40% e centrifugadas por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi analisado por CLAE (FARAH et al., 2005). A recuperação da extração foi avaliada pela adição de quantidades

conhecidas de 3-CQA, 4-CQA e 5-CQA (Sigma-Aldrich) em alíquotas de plasma que não continham ACGs.

#### *4.2.4.6.2 Extração dos ácidos clorogênicos da urina*

O pH de cada alíquota de urina foi ajustado para 5,0 com acetato de sódio. Uma alíquota foi submetida ao tratamento enzimático com 10 µl β-glicuronidase e sulfatase (1.000 e 29 UI, respectivamente) e incubada por 2 h a 37 °C. A outra alíquota foi analisada sem o tratamento enzimático. Ambas as amostras foram acidificadas com HCl 3 N/metanol 40% e agitadas em vortex. O conteúdo foi transferido para um tubo Amicon Ultra (Millipore) com filtro de celulose e centrifugado a 17.000 x g por 30 min à temperatura ambiente. O sobrenadante foi analisado por CLAE nas mesmas condições das análises nas amostras de plasma (MONTEIRO et al., 2007).

### **4.2.5 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS PARA AS ANÁLISES EM CLAE**

Estratégias para o desenvolvimento e otimização do método cromatográfico para a quantificação simultânea de ácidos fenólicos e metilxantinas foram aplicadas com a finalidade de obter a separação de todos os compostos de interesse, em menor tempo de análise e em corrida cromatográfica única.

As amostras de erva-mate, plasma e urina foram analisadas por CLAE de acordo com metodologia descrita por Farah et al. (2005), com modificações no gradiente de fase móvel (Tabela 1). Utilizou-se uma coluna de fase reversa Supelco C18 (4,6 mm x 250 mm, 5 µm) e pré-coluna Phenomenex C18 (4 mm x 2 mm, 5µm) em equipamento com injetor manual, conectado ao degaseificador DGU 20A5 com integrador CBM 20A e detector UV-Visível DAD SPD-M20A (Shimadzu, Kyoto, Japão) operando em 325 nm para a detecção de ACGs e outros ácidos hidroxinânicos e 280 nm para cafeína, teobromina, e ácidos gálico, hipúrico e dihidrocaféico.

A fase móvel foi composta de 80% de uma solução de ácido cítrico 10 mM acidificada ao pH de 2,5 com ácido clorídrico 6N e 20% de metanol (Fase A) e metanol (Fase B). O fluxo utilizado foi de 1,0 mL/min em um gradiente linear com as condições abaixo:

**Tabela 1** – Condições cromatográficas para análise em CLAE.

<b>Tempo (min)</b>	<b>Fase A (% v/v)</b>	<b>Fase B (%v/v)</b>
0,01	100	0
15	80	20
25	80	20
30	100	0

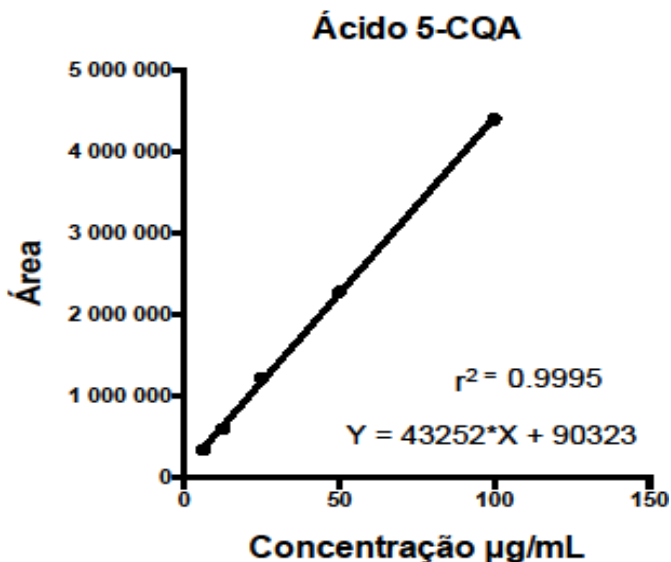
A identificação dos compostos foi realizada por comparação dos tempos de retenção com seus respectivos padrões e a quantificação foi calculada a partir da curva analítica. Os compostos não identificados com os padrões comerciais foram quantificados por equivalentes de ácido dihidrocafeico e de 5-CQA quando absorvidos em 280 e 325 nm, respectivamente.

#### 4.2.5.1 Identificação dos metabólitos dos ACGs e metilxantinas em plasma e urina

A identificação dos ACGs, seus metabólitos, ácidos hidroxinâmicos e metilxantinas foi realizada por comparação dos tempos de retenção com seus respectivos padrões, conforme exemplificado na Figura 5 para o padrão 5-cafeoilquínico. Após a obtenção das curvas de calibração, o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) para todos os padrões analisados foi superior a 0,999. Os compostos que não foram identificados foram expressos em equivalentes de 5-CQA quando absorvidos em 325 nm, e equivalentes de ácido dihidrocafeico quando absorvidos em 280 nm, por apresentarem espectro de absorção semelhantes aos mesmos.



**Figura 5** – Curva de calibração do padrão 5-cafeoilquínico (5-CQA).



#### 4.2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente verificou-se a normalidade dos dados. As variáveis foram submetidas ao teste paramétrico de ANOVA de uma via para medidas repetidas e as diferenças significativas avaliadas pelo Teste de Tukey, uma vez que os dados apresentaram distribuição normal. Em todas as conclusões obtidas através das análises estatísticas foi utilizado o nível de significância menor ou igual a 5% ( $p < 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO DE ERVA-MATE

#### 5.1.1 Teor de saponinas, fenóis totais e medidas da capacidade antioxidante total

Para a escolha do extrato utilizado neste estudo algumas análises foram realizadas previamente, com o objetivo de escolher aquele com a maior concentração de compostos fitoquímicos, principalmente os fenólicos.

O teor de saponinas totais, fenóis totais e a atividade antioxidante dos extratos foram confirmados em ensaios *in vitro* (Tabela 2). Estudo sobre a biodisponibilidade das saponinas foi conduzido em paralelo por Fernanda Alves Cruz (2016). Como pode ser observado, o ENPEMV apresentou concentração maior de saponinas totais e fenóis totais em relação ao ENPEMT. A partir desses testes o ENPEMV verde foi definido como o extrato a ser ofertado aos participantes deste estudo. Resultados semelhantes foram observados para a capacidade antioxidante total, os quais estão de acordo com estudos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa que obtiveram dados comparativos quanto às características químicas da erva-mate verde e tostada (ANDRADE, 2011; BECKER, 2013).

**Tabela 2** - Teor de saponinas, fenólicos totais e medidas da capacidade antioxidante total (FRAP e TAC) no extrato nebulizado padronizado de erva-mate verde e tostada.

	Extrato Nebulizado Padronizado de Erva-mate	
	Verde	Tostada
	mg/g	mg/g
Saponinas <sup>*</sup>	76,1 ± 0,4	47,4 ± 1,6
Saponinas Totais <sup>**</sup>	49,5 ± 0,2	21,9 ± 0,1
Fenóis Totais <sup>*</sup>	422,9 ± 2,1	302,7 ± 6,5
	mmol/g	mmol/g
FRAP <sup>*</sup>	1,96 ± 0,04	1,77 ± 0,18
TAC <sup>*</sup>	1,55 ± 0,05	0,94 ± 0,03

Resultados expressos como média ± DP. FRAP = Potencial antioxidante redutor de ferro; TAC = Capacidade antioxidante total. <sup>\*</sup>Ensaios colorimétricos realizados com três amostras em triplicata. <sup>\*\*</sup> Análise por CLAE realizada com três amostras em triplicata.

### **5.1.2 Caracterização dos compostos fenólicos e metilxantinas do extrato nebulizado padronizado de erva-mate por CLAE**

As análises por CLAE foram realizadas apenas para o ENPEMV, que foi utilizado no presente estudo. Com base nos tempos de retenção e espectros de absorção no ultravioleta (UV) foram detectadas as metilxantinas teobromina e cafeína. O principal alcaloide purínico encontrado no extrato nebulizado foi a cafeína (85%) e em menor quantidade a teobromina (15%), enquanto a teofilina não foi detectada na amostra.

Diversos estudos têm quantificado as metilxantinas, como cafeína e teobromina, na erva-mate, tanto em folhas quanto em produtos comerciais, sendo que o teor desses compostos difere de acordo com a matéria prima utilizada e preparo do mate, podendo variar de 25-175 mg para a cafeína e de 6,0-28,5 mg para a teobromina (LARA; JUNIOR; MORAND, 2016). Segundo Bastos et al. (2006), o teor de metilxantinas aumenta após os estágios de secagem de folhas de erva-mate, podendo assim ocorrer diferenças nos resultados de processamentos tecnológicos, avaliando-se principalmente o tempo e a temperatura de exposição das folhas e a metodologia de extração. Nossos resultados estão de acordo com outros estudos que identificaram apenas cafeína e teobromina no extrato de erva-mate (STRASSMANN et al., 2008; MEINHART et al., 2010a; BOJIT et al., 2013; COGOI et al., 2013; PINTO et al., 2015).

A ingestão de cafeína e teobromina no mate foi comparada com outros produtos como café, bebidas energéticas, pó de guaraná e chocolate e mostrou que a quantidade de cafeína consumida em 100 mL de chimarrão e terere, corresponde a 10 e 24 mL de café expresso, 118 e 277 de refrigerantes a base de cola, 34 e 80 mL de bebidas energéticas ou 0,5 e 1,1 g de pó de guaraná, respectivamente. Para a teobromina, as quantidades ingeridas através do chimarrão e tererê foram equivalentes a 6,2 e 14,5 g presentes uma barra de chocolate ao leite (MEINHART et al., 2010b)

Da classe dos fenólicos foram identificados seis compostos da família dos ACGs, sendo três isômeros do ácido cafeoilquínico e três do ácido dicafeoilquínico. Os ácidos cafeico, ferúlico e *p*-cumárico não foram detectados nas formas livres. A concentração dos compostos presentes na erva-mate é apresentado na Tabela 3, o perfil cromatográfico na Figura 6, e os espectros de absorção na Figura 7.

**Tabela 3** – Teor de compostos fenólicos e metilxantinas no extrato nebulizado padronizado de erva-mate verde.

COMPOSTO	PICO	TR (min)	(mg/g)
Teobromina	1	4,6	7,37 ± 0,23
Ácido 3-cafeoilquínico	2	5,2	54,56 ± 2,79
Ácido 5-cafeoilquínico	3	8,1	53,46 ± 2,87
Cafeína	4	8,7	44,27 ± 3,91
Ácido 4-cafeoilquínico	5	9,4	67,90 ± 3,56
Ácido 3,5-dicafeoilquínico	6	17,9	121,90 ± 8,22
Ácido 3,4-dicafeoilquínico	7	19,3	9,77 ± 0,42
Ácido 4,5-dicafeoilquínico	6	24,5	94,71 ± 4,16

Valores expressos em média ± DP (n = 15). TR, tempo de retenção.

O teor de fenóis totais, calculado pela soma do teor dos ACGs, foi de 402,3 mg/g, enquanto o teor de fenóis totais determinado pelo método de Folin-Ciocalteu foi de 422,9 mg/g, em equivalentes de 5-CQA. O método Folin-Ciocalteu é menos específico que a determinação por CLAE, uma vez que são quantificados quaisquer compostos com atividade redutora, que podem reagir com o reagente de Folin (Oliveira, 2013). Diante disso, foram utilizados os dados de fenólicos totais por CLAE para o cálculo da quantidade de ACGs a serem ofertados aos voluntários (Tabela 4).

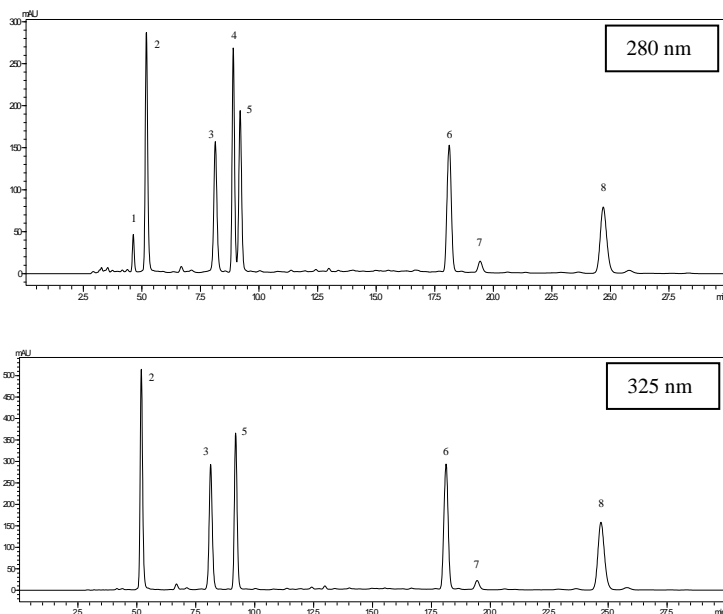
**Tabela 4** - Teor de ácidos clorogênicos (ACGs) e metilxantinas no extrato nebulizado padronizado de erva-mate.

Teor (mg/300 mL)	
<b>ACGs</b>	
3-CQA	245,52 ± 41,86
5-CQA	240,57 ± 43,12
4-CQA	305,55 ± 53,36
3,5-diCQA	548,55 ± 89,02
3,4-diCQA	43,96 ± 6,39
4,5-diCQA	426,19 ± 62,43
<b>Metilxantinas</b>	
Cafeína	33,16 ± 23,06
Teobromina	199,21 ± 3,44

Valores expressos em média ± DP, n = 15.

CQA: ácido cafeoilquínico; diCQA: ácido dicafeoilquínico

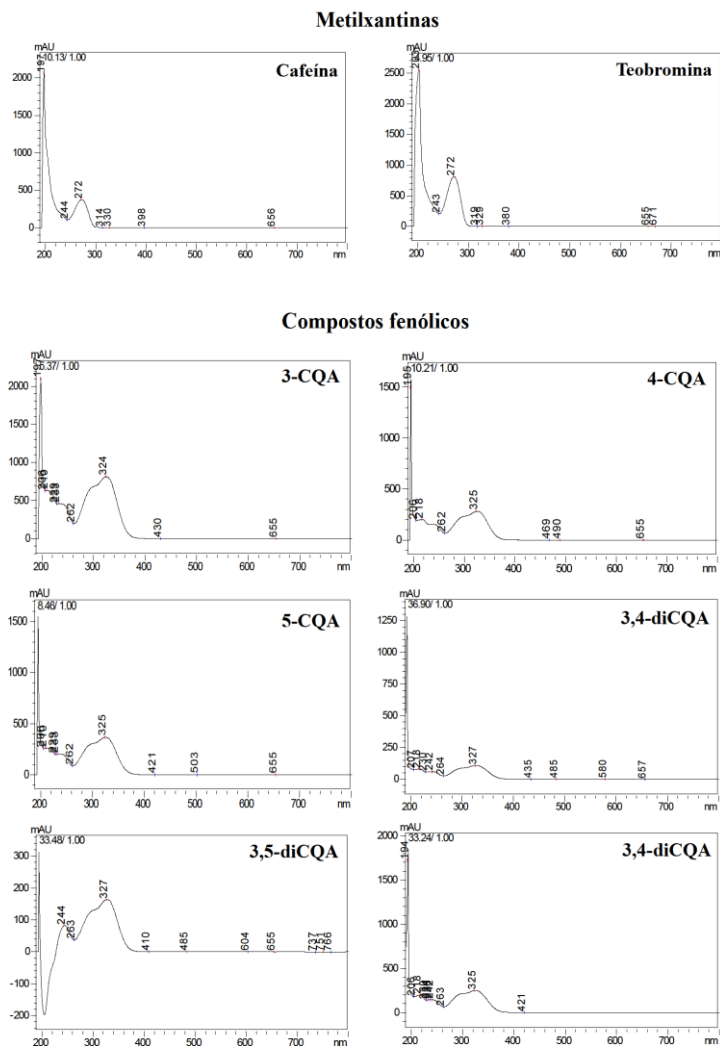
**Figura 6** - Cromatograma representativo do perfil das metilxantinas e dos compostos fenólicos do extrato nebulizado padronizado de erva-mate verde obtido em CLAE ( $\lambda = 280$  nm e 325 nm).



Picos: (1) teobromina; 2) 3-CQA; 3) 5-CQA; (4) cafeína; 5) 4-CQA; 6) 3,5-diCQA; 7) 3,4 diCQA; 8) 4,5 diCQA.

Infusões de erva-mate possuem grande quantidade de compostos fenólicos, principalmente os ACGs, os quais têm sido amplamente estudados devido à sua capacidade antioxidante (GUGLIUCCI, 1996; BASTOS et al., 2007b; BERTÉ et al., 2011; GAO et al., 2013). Neste estudo, foi possível verificar aumento na quantidade dos compostos fenólicos do extrato verde em relação ao tostado. Estes resultados estão de acordo com Bastos et al. (2007b) que descreveram que o mate tostado apresenta essencialmente os mesmos componentes da erva-mate verde.

**Figura 7** - Espectros de absorção DAD dos compostos encontrados no extrato nebulizado de erva-mate.



## 5.2 EXTRATO DE ERVA-MATE OFERTADO AOS PARTICIPANTES

Os resultados do teor de compostos determinados no extrato de erva-mate ofertada aos participantes estão presentes na Tabela 4. Quanto aos ACGs, seis compostos majoritários (3-CQA, 4-CQA, 5-CQA, 3,5-diCQA, 3,4-diCQA, 4,5 diCQA) foram identificados na bebida ofertada. Os compostos fenólicos mais abundantes foram os diCQA, cuja soma corresponde a 57% do total de fenólicos quantificados, seguidos pelos CQA (43%). Teores inferiores de ácidos dicafeoilquínicos, quando comparados aos cafeoilquínicos, foram relatados em outros estudos (MONTEIRO et al., 2007; STALMACH et al., 2009; RENOUF et al., 2014).

## 5.3 CARACTERÍSTICAS BIODEMOGRÁFICAS DOS INDIVÍDUOS

Participaram do estudo oito indivíduos (cinco mulheres e três homens) considerados saudáveis por meio de questionário clínico e resultados laboratoriais com valores dentro dos limiares de referência para os parâmetros bioquímicos avaliados (ureia e creatinina, transaminases, fosfatase alcalina, creatina quinase, perfil lipídico, glicose, ácido úrico e hematócrito). As características dos participantes estão apresentadas na Tabela 5. Não foram observadas reações adversas ou efeitos colaterais durante o estudo.

**Tabela 5** - Características bioquímicas e antropométricas dos voluntários (n = 8).

Características	Valores	Intervalo de Referência
Idade (anos)	24,3 ± 2,4	–
Estatura (cm)	171,2 ± 10,3	–
Peso corporal (kg)	65,6 ± 14,6	–
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	22,1 ± 3,0	–
CT (mg/dL)	175,1 ± 31,5	0 – 200
LDL-c (mg/dL)	99,2 ± 26,9	0 – 99
HDL-c (mg/dL)	68,5 ± 18,4	40 – 60
TG (mg/dL)	70,5 ± 19,5	30 – 150
Glicose (mg/dL)	94,12 ± 4,8	74 – 106
AST (U/L)	23,12 ± 5,3	10 – 40
ALT (U/L)	29,25 ± 15,5	12 – 78
Fosfatase Alcalina (U/L)	54,75 ± 13,2	46 – 116
Ureia (mg/dL)	29,12 ± 5,3	15 – 39
Ácido Úrico (mg/dL)	4,27 ± 1,2	2,6 – 7,2
Creatina Quinase (U/L)	117,12 ± 45,0	26 – 308
Creatinina Urinária (mg/dL)	80,9 ± 49,9	30 – 125

Os resultados estão expressos em média ± DP. IMC, índice de massa corporal; CT, colesterol total; LDL-c, colesterol ligado à lipoproteína de baixa densidade; HDL-c, colesterol ligado à lipoproteína de alta densidade; TG, triglicerídeos.

#### 4.2.2 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS ANALÍTICOS

Alguns parâmetros de validação de método analítico foram empregados neste estudo de acordo com parâmetros de qualidades nacionais (ANVISA, 2003) e internacionais (ICH, 2005). Sendo assim, avaliou-se a precisão do método (repetibilidade), a estabilidade da amostra de plasma, a taxa de recuperação dos compostos de interesse e foram calculados os limites de detecção e quantificação dos principais compostos fenólicos e metilxantinas presentes no extrato de erva-mate.

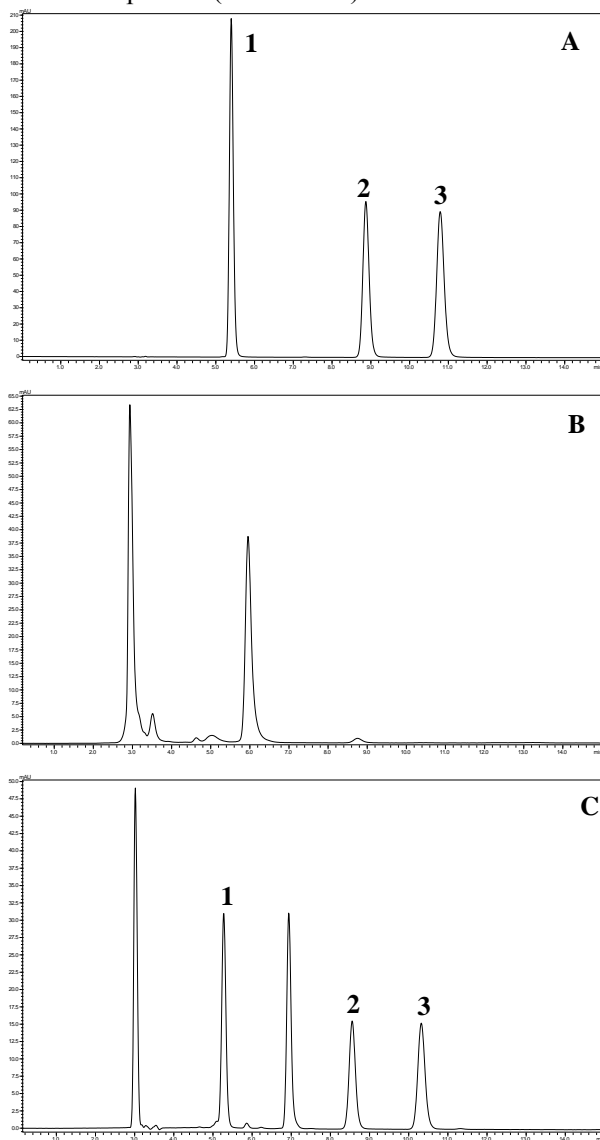
Ao avaliar a reprodução do método analítico, analisou-se a precisão intra e inter-dia dos compostos presentes no extrato, totalizando 15 injeções. O desvio padrão obtido para cada composto foi baixo,



indicando que o processo de análise em CLAE foi reprodutível com relação à análise dos compostos fenólicos e metilxantinas (Tabela 3).

Calculou-se a taxa de recuperação dos ácidos cafeoilquínicos em amostras de plasma para avaliar o quanto o método seria eficaz para a detecção dos compostos, mesmo após o processamento da amostra. Os resultados foram de 62% para o 5-CQA, 49% para o 4-CQA e 46% para o 3-CQA. Os cromatogramas representativos desse teste estão presentes na Figura 8. De acordo com Cremim et al. (2001), devido à porção de açúcar ligada às moléculas de ácidos clorogênicos, os resultados de recuperação podem ser inferiores quando comparados aos ácidos fenólicos livres. Além disto, a polaridade das moléculas pode afetar diretamente a eficiência de extração de compostos com solventes orgânicos (CREMIN; KASIM-KARAKAS; WATERHOUSE, 2001).

**Figura 8** - Cromatogramas representativos do teste de recuperação dos ácidos monocateoilquínicos (CQA) após a adição de três padrões em amostra de plasma ( $\lambda = 325$  nm).



A) Padrões; B) Plasma com ausência de CQA; C) Plasma após adição dos padrões.  
Picos: 1) 3-CQA; 2) 5-CQA; 3) 4-CQA.

Para a avaliação de estabilidade dos ácidos fenólicos, foram utilizadas amostras de plasma obtidas de sangue coletado 1 h após a ingestão da erva-mate. Após o plasma ter permanecido durante 24 h e 7 dias à -80 °C, observou-se diminuição dos compostos presentes na amostra em  $11,8 \pm 2,28\%$  e de  $43,5 \pm 10,08\%$ , respectivamente. Segundo a Resolução 899, ANVISA (2003), a variação aceitável de compostos presentes em uma amostra biológica é de até 15%. Assim, com base nos resultados, os ácidos fenólicos permaneceram estáveis no plasma apenas por 24 h de armazenamento. Desta forma, todas as análises deste estudo foram conduzidas no dia seguinte à coleta do sangue, dentro de 24 h. O tempo de estabilidade está possivelmente relacionado à complexidade da matriz biológica e aos compostos fenólicos a serem detectados. A análise de ACG em fluidos biológicos é muito complexa, devido à labilidade desses compostos em condições variáveis, como o aumento da temperatura e de pH (PEREIRA, 2004).

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) dos compostos fenólicos e metilxantinas foram calculados a partir de suas respectivas curvas analíticas (curvas-padrão?). Segundo a Anvisa (2003), o LD corresponde à concentração necessária para gerar uma resposta três vezes superior ao ruído da linha de base e indica a concentração mínima capaz de ser detectada através do método cromatográfico, enquanto o LQ corresponde à concentração mínima do analito necessária para gerar valores que permitam a quantificação com precisão e exatidão, com respostas correspondendo a 10 vezes superior ao ruído da linha de base. Os valores de LD e LQ estão apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6** - Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) dos compostos presentes no extrato de erva-mate.

Composto	LD ( $\mu\text{g/mL}$ )	LQ ( $\mu\text{g/mL}$ )
3-CQA	0,14	0,45
5-CQA	0,11	0,35
4-CQA	0,04	0,12
3,5-diCQA	0,02	0,07
3,4-diCQA	0,01	0,05
4,5-diCQA	0,02	0,06
Ácido cafeico	0,14	0,43
Cafeína	0,38	1,17
Teobromina	0,04	0,01

CQA: ácido cafeoilquínico; diCQA: ácido dicafeoilquínico

O método utilizado neste estudo se mostrou eficaz para a separação de 15 compostos em uma única corrida cromatográfica, sendo estes, os ácidos fenólicos: 3, 4 e 5-CQA, 3,4, 3,5, 4,5-diCQA, cafeico, sinápico, ferúlico, *p*-cumárico, dihidrocafeico, hipúrico, vanílico e as metilxantinas: cafeína e teobromina. Além disto, a otimização do método possibilitou um melhor aproveitamento do tempo de análise, que foi de 30 min para cada corrida. A utilização de métodos cromatográficos que permitam a avaliação de vários compostos simultaneamente é extremamente importante, por possibilitar a identificação de vários marcadores fitoquímicos em uma única corrida cromatográfica, diminuindo o tempo de análise (PINTO et al., 2015).

#### 5.4 ANÁLISE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS *IN VIVO* APÓS INGESTÃO DO EXTRATO NEBULIZADO PADRONIZADO DE ERVA-MATE VERDE

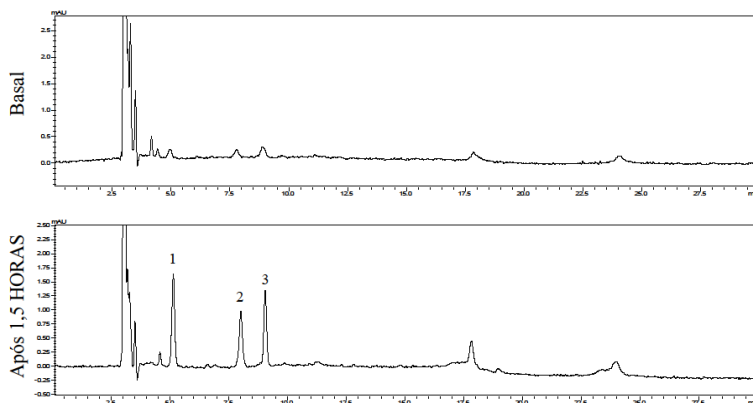
##### 5.4.1 Identificação de compostos fenólicos e metilxantinas no plasma por CLAE

No plasma de três voluntários saudáveis, foram observados ACGs livres (agliconas), os quais não tiveram as concentrações calculadas devido à baixa amplitude dos picos. A Figura 9 apresenta um cromatograma obtido após 1,5 horas da ingestão da erva-mate em que é possível observar a baixa amplitude dos picos. Estudos similares reportaram uma baixa concentração de ACGs livres após a ingestão de café (STALMACH et al., 2009; LANG et al., 2013; RENOUF et al., 2014), indicando um rápido metabolismo dos ACGs. Em outra investigação, não se detectou esses compostos livres em amostras plasmáticas, apenas na forma de metabólitos (NARDINI et al., 2002). Há controvérsias quanto à absorção de ACGs após a ingestão de café. Por exemplo, ACGs livres foram detectados no plasma de indivíduos saudáveis durante 4 h após a ingestão, indicando que esses compostos são biodisponíveis (MONTEIRO et al., 2007; FARAH et al., 2008).

Desta forma, em estudos futuros, outros métodos de detecção deverão ser empregados para confirmar a ausência de ACGs livres no plasma após a ingestão de erva-mate, como a espectrometria de massas. O alto desempenho da CLAE associado à espectrometria de massa tem sido utilizado para a caracterização estrutural de fenólicos e para análise de amostras em plasma humano, pois através dessas análises é possível conhecer e quantificar um composto de acordo com a sua massa/carga (ANGELO; JORGE, 2007).

Os ACGs são pouco absorvidos quando comparados aos ácidos fenólicos livres, sendo que os metabólitos originados a partir do ácido cafeico são os compostos mais abundantes em amostras plasmáticas e estão associados com o metabolismo no cólon intestinal (RENOUF et al., 2010). Além disto, o tempo máximo de absorção dos ACGs também está diretamente relacionado com a dose ingerida, ou seja, pequenas doses são rapidamente absorvidas e metabolizadas e vice-versa (WILLIAMSON; DIONISI; RENOUF, 2011; RENOUF et al., 2014).

**Figura 9** – Cromatograma representativo da detecção de ácidos clorogênicos intactos no plasma após 1,5 h da ingestão de erva-mate ( $\lambda = 325$  nm).



Picos: 1. 3-CQA, 2. 5-CQA, 3. 4-CQA.

Neste estudo, os compostos fenólicos derivados das primeiras fases de metabolização dos ACGs, como por exemplo os ácido cafeico e ferúlico não foram detectados no plasma de nenhum indivíduo. Esse resultado está de acordo com os achados de Renouf et al. (2010), que observaram que os metabólitos produzidos e absorvidos no cólon, como o ácido dihidrocafeico (DHCA) são detectados com mais frequência no plasma do que metabólitos que podem aparecer logo após a ingestão como o ácido cafeico, ferúlico, assim como as suas formas glicuronadas e/ou sulfatadas.

Nas amostras de plasma que não passaram por hidrólise enzimática apenas um metabólito originado da metabolização dos ACG foi identificado no plasma de 4 indivíduos, o DHCA, o qual é formado pela ação da microbiota intestinal que faz a conversão dos ACG em

ácido cafeico e, posteriormente, em DHCA (OLIVEIRA, 2013). O intestino grosso está diretamente relacionado com a absorção dos ACG. Stalmach et al. (2010) observaram diferenças significativas no aumento da excreção destes compostos e seus metabólitos em indivíduos saudáveis, quando comparados com indivíduos ileostomizados, que não possuem uma porção do intestino grosso (STALMACH et al., 2010).

Os isômeros de ACG mais abundantes na bebida ofertada aos participantes foram os diCQAs (Tabela 4), porém, esses compostos não foram detectados nas amostras de plasma, o que reforça trabalhos anteriores de que os derivados dicafeoilquínicos não são biodisponíveis, provavelmente devido ao seu alto peso molecular (STALMACH et al., 2009, 2010; RENOUF et al., 2010). Oliveira (2013) sugere que as ligações éster dos ácidos cafeicos nas moléculas de diCQA sejam clivadas mais facilmente que a ligação éster dos CQAs, liberando quantidade maior de ácido cafeico, o qual seria encaminhado para a corrente sanguínea na forma livre ou após o metabolismo por enzimas endógenas de fase II ou pela microbiota intestinal. Esse comportamento sugere que o aparecimento de DHCA no plasma de alguns indivíduos 1 hora após a ingestão do mate (Figura 10) se deveu, provavelmente, à alta concentração de diCQA na bebida ingerida, seguida de uma extensiva metabolização desses compostos no cólon pela microbiota intestinal.

Além do DHCA, foram detectados outros dois possíveis metabólitos dos ACGs com espectro de absorção semelhante, e por isto, quantificados em equivalentes de DHCA (Tabela 7). Desta forma foi possível estimar a quantidade destes compostos que estão presentes no plasma após a ingestão do mate. A complexidade do metabolismo dos ACG e dos ácidos fenólicos impossibilita a identificação de todos os metabólitos em um único método, além disto, ao tentar identificar diversos compostos é possível que uma grande parte fique abaixo do limite de quantificação (RENOUF et al., 2014). Outro fator importante a ser considerado ao se analisar a biodisponibilidade de ACGs em fluidos biológicos são fatores como a degradação pela microbiota intestinal e por enzimas, a decomposição no lúmen intestinal e o metabolismo de primeira passagem no fígado (CHOUDHURY et al., 1999).

O metabólito identificado como M1 foi detectado no plasma de todos os indivíduos após a ingestão da erva-mate, inclusive no tempo basal. Com base no tempo de retenção, sugere-se que esse metabólito seja o ácido hipúrico, porém devido as diferenças entre o espectro de absorção deste composto e do padrão comercial não foi possível realizar a confirmação. Acredita-se que a formação de ácido hipúrico é

proveniente do ácido quínico e do ácido cafeico liberados de parte das moléculas dos ácidos cafeoilquínicos e dicafeoilquínicos antes e/ou depois de serem absorvidos (GONTHIER et al., 2003; OLTHOF et al., 2003) ou a partir dos aminoácidos triptofano, tirosina e fenilalanina (OLIVEIRA, 2013), o que explicaria a presença deste possível metabólito na amostra basal de todos os indivíduos.

De forma geral, uma grande variação interpessoal foi observada no perfil farmacocinético dos compostos (Figura 10). De acordo com Manach et al. (2004), as diferenças na capacidade de metabolização de compostos fenólicos podem ser originadas a partir de diferenças na atividade do sistema citocromo P450 ou de sistemas que podem ser influenciados por polimorfismo genético.

**Tabela 7** - Quantificação dos compostos detectados ( $\mu\text{g/mL}$ ) no plasma de indivíduos saudáveis sem tratamento enzimático com  $\beta$ -glicuronidase e sulfatase, antes (basal) e após a ingestão de 300 mL de extrato nebulizado padronizado de erva-mate verde.

Compostos	n	Basal	1 h	1,5 h	2 h	3 h	4 h
<b>DHCA</b>	4	$2,09 \pm 0,88$	$2,75 \pm 0,48$	$3,50 \pm 0,34$	$3,27 \pm 0,33$	$3,66 \pm 0,30$	$3,32 \pm 0,23$
<b>Metabólito 1</b>	8	$9,17 \pm 3,58$	$8,34 \pm 4,05$	$7,57 \pm 1,60$	$8,47 \pm 2,21$	$9,59 \pm 2,61$	$7,72 \pm 2,75$
<b>Metabólito 2</b>	4	$1,37 \pm 0,37$	$1,69 \pm 0,27$	$4,06 \pm 0,36$	$2,64 \pm 0,42$	$0,98 \pm 0,29$	$1,64 \pm 0,28$

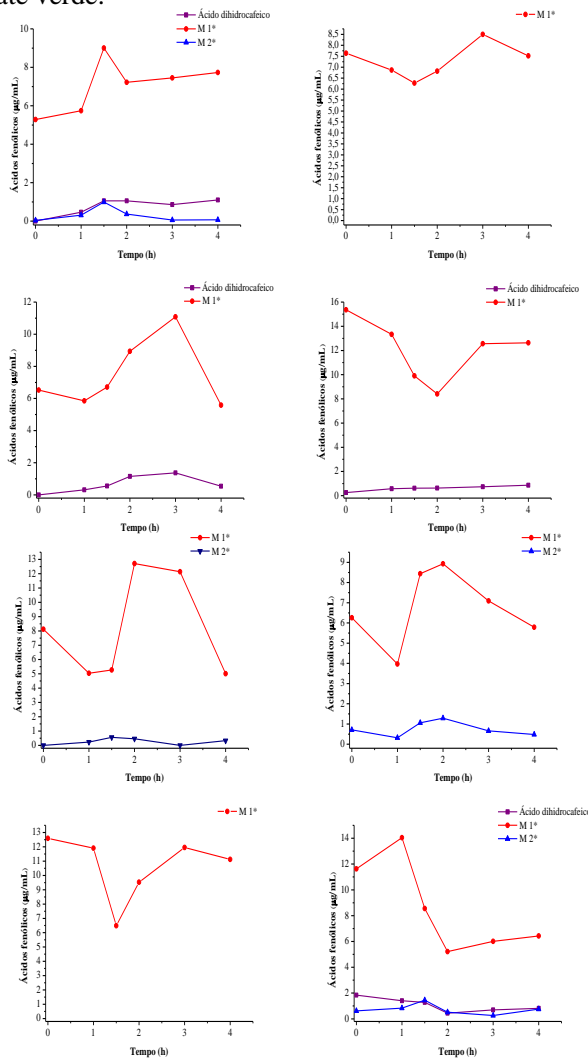
DHCA: ácido dihidrocafeico

Valores expressos como média  $\pm$  DP

n = número de indivíduos em que foram detectados os respectivos compostos.



**Figura 10** - Perfil dos compostos fenólicos detectados no plasma de indivíduos saudáveis, sem tratamento enzimático com  $\beta$ -glucuronidase e sulfatase, após a ingestão de 300 mL de extrato nebulizado padronizado de erva-mate verde.



\* Os metabólitos não identificados foram quantificados por equivalentes de ácido dihidrocafeico.

A maior parte dos trabalhos a respeito da biodisponibilidade dos ACGs foi realizada com café, em seres humanos (MONTEIRO et al., 2007; FARAH et al., 2008; STALMACH et al., 2009, 2010; RENOUF et al., 2010; DUARTE; FARAH, 2011), ou 5-CQA em seres humanos (OLTHOF; HOLLMAN; KATAN, 2001; OLTHOF et al., 2003) e em animais (AZUMA et al., 2000; GONTHIER et al., 2003; LAFAY et al., 2006). No entanto, devido às diferentes quantidades ingeridas e variedade dos metabólitos avaliados, a comparação entre os diferentes estudos acerca da biodisponibilidade torna-se complexa. Além disto, são observadas diferenças entre os perfis de ácidos clorogênicos do café nos trabalhos citados e da erva-mate avaliada no presente estudo. Enquanto o café apresenta maior proporção de ácidos monocateoilquínicos, e em pequenas quantidades os ácidos dicafeoilquínicos, no ENPEMV há predominância dos ácidos dicafeoilquínicos. A matriz alimentícia e a forma de liberação dos ACGs modulam os parâmetros farmacocinéticos, principalmente o tempo máximo de absorção desses compostos (RENOUF et al., 2010). É conhecido que a biodisponibilidade de compostos naturais pode ser diferente se administrado o composto isolado ou em uma mistura como em extrato de plantas (RONDINI et al., 2004). Oliveira (2013), ao avaliar a biodisponibilidade dos ACGs da erva-mate comparada ao padrão de 5-CQA puro em ratos, demonstrou que o perfil dos ácidos clorogênicos presentes na bebida influenciou qualitativamente e quantitativamente os metabólitos formados após a ingestão.

Oliveira (2013) também encontrou baixas concentrações de ACGs livres no plasma de ratos após a administração de chá mate por gavagem, assim como metabólitos formados pela ação de estearases microbianas no intestino, como o DHCA, o que está de acordo com nossos resultados. Entretanto, não é possível fazer uma comparação detalhada, como em relação ao tempo de absorção de tais compostos, pois existem diferenças importantes no perfil de absorção entre os ratos e os seres humanos (RIVELLI et al., 2011).

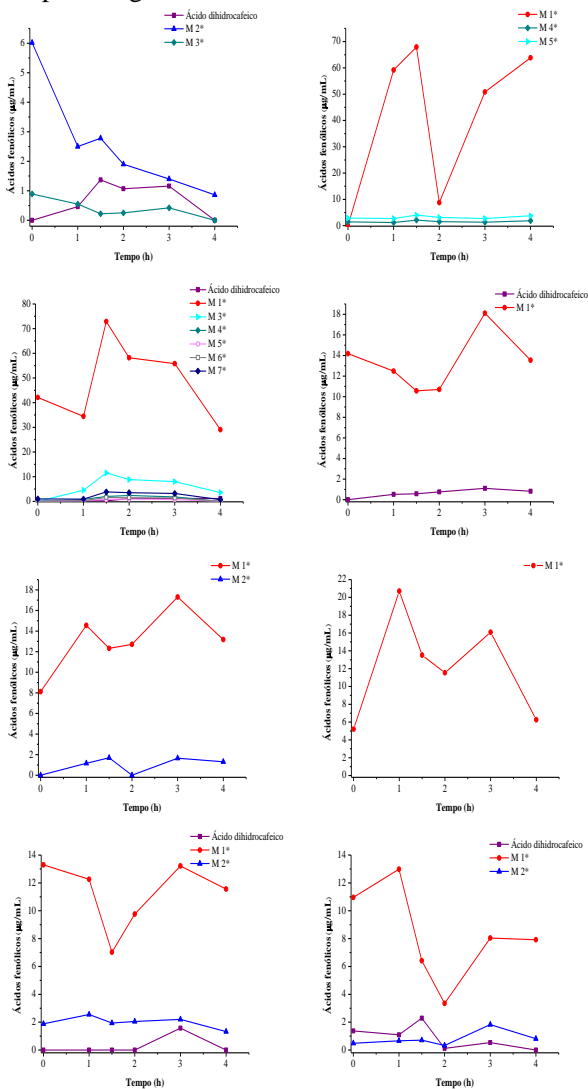
Os ácidos fenólicos aparecem no plasma principalmente na forma conjugada aos grupos glicuronídeo, sulfato ou metil (NARDINI et al., 2002; MONTEIRO et al., 2007; STALMACH et al., 2009; REDEUIL et al., 2011). A conjugação dos ACGs com ácido glicurônico foi primeiramente considerada por Booth et al. em 1957. A utilização de  $\beta$ -glicuronidase nas análises de plasma e urina, ao longo dos últimos anos, tem auxiliado na detecção e quantificação de metabólitos do 5-CQA e de outros hidroxycinamatos (PEREIRA, 2004).

No presente estudo, nas amostras de plasma incubadas com as enzimas  $\beta$ -glicuronidase e sulfatase, foi novamente identificado o DHCA, além de outros quatro possíveis metabólitos que não haviam sido detectados nas amostras que não passaram pela hidrólise enzimática (Figura 12). A conjugação dos ácidos fenólicos ocorre possivelmente no fígado, pois foi constatado que no intestino grosso não ocorre a conjugação destes compostos (POQUET; CLIFFORD; WILLIAMSON, 2007). Não foram detectados ACGs, formas conjugadas na amostra de plasma de nenhum indivíduo.

Os resultados das concentrações do DHCA e possíveis metabólitos conjugados estão apresentados na Tabela 8. O cálculo foi realizado a partir da média de concentração dos compostos detectados entre os indivíduos. Desta forma o “n” utilizado para o cálculo da média e desvio padrão variou para cada composto. Observou-se aumento na concentração do metabólito 1 (M1) em relação às amostras que não passaram pela hidrólise enzimática. Cremin et al. (2001) também observaram aumento de compostos fenólicos no plasma após a incubação das amostras com a enzima sulfatase, após a ingestão de café, sugerindo que diversos compostos estão presentes no plasma na forma conjugada.

Assim como nas amostras de plasma não incubadas com a enzima, foi observada uma grande variabilidade interpessoal na distribuição dos ácidos fenólicos, como foi possível observar na Figura 11, sendo que três compostos apareceram apenas para um indivíduo (M5, M6 e M7). A proporção da absorção dos metabólitos depende da susceptibilidade de organelas (como receptores, enzimas, transportadores) e pode variar de acordo com a microbiota intestinal e perfil genético de cada indivíduo avaliado, não sendo possível quantificar a magnitude destas variações (DEL RIO et al., 2010).

**Figura 11** - Perfil dos compostos fenólicos detectados no plasma de indivíduos saudáveis após tratamento enzimático com  $\beta$ -glicuronidase e sulfatase, após a ingestão de 300 mL de ENPEMV.



\*Os metabólitos não identificados foram quantificados por equivalentes de ácido dihidrocaféico.

**Tabela 8** - Quantificação dos compostos detectados ( $\mu\text{g/mL}$ ) no plasma de indivíduos saudáveis após tratamento enzimático com  $\beta$ -glicuronidase e sulfatase, antes (basal) e após a ingestão de 300 mL de extrato nebulizado padronizado de erva-mate verde.

Compostos	n	Basal	1 h	1,5 h	2 h	3 h	4 h
DHCA	5	$1,37 \pm 0,61$	$2,41 \pm 0,39$	$4,38 \pm 0,95$	$3,09 \pm 0,53$	$3,97 \pm 0,37$	$1,97 \pm 0,55$
Metabólito 1	8	$19,61 \pm 21,57$	$27,10 \pm 18,55$	$30,14 \pm 28,64$	$25,43 \pm 22,47$	$28,42 \pm 19,50$	$18,99 \pm 19,52$
Metabólito 2	4	$8,39 \pm 2,73$	$6,87 \pm 0,95$	$7,13 \pm 0,85$	$4,28 \pm 1,05$	$7,08 \pm 0,33$	$4,30 \pm 0,27$
Metabólito 3	3	$0,77 \pm 0,55$	$0,83 \pm 0,46$	$1,43 \pm 0,93$	$1,39 \pm 0,92$	$1,16 \pm 0,70$	$0,63 \pm 0,66$
Metabólito 4	3	$1,73 \pm 1,53$	$1,55 \pm 1,23$	$1,90 \pm 1,83$	$1,64 \pm 1,28$	$1,58 \pm 1,03$	$1,52 \pm 1,99$

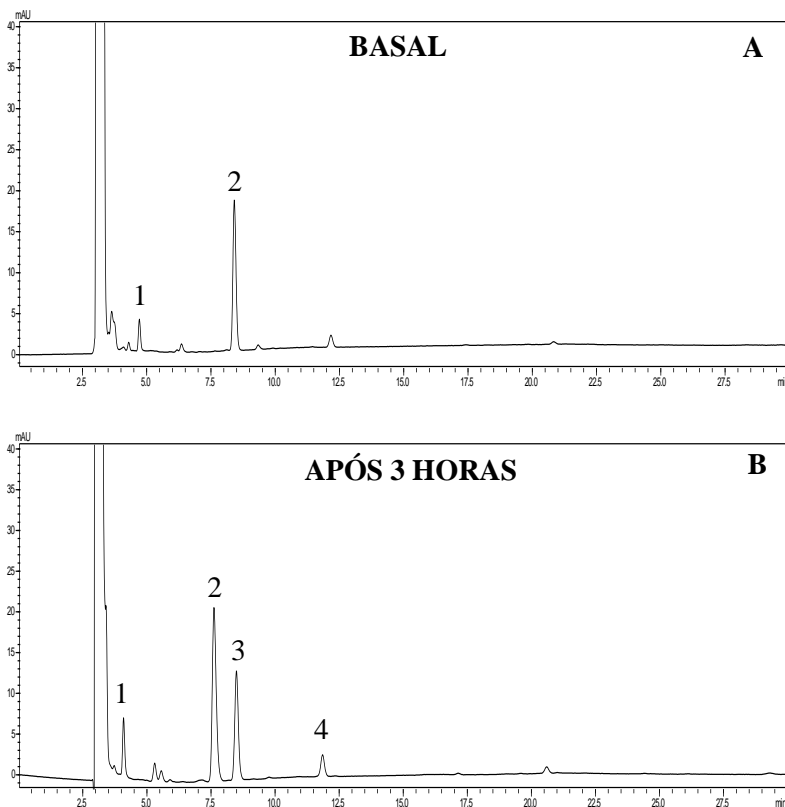
DHCA: ácido dihidrocafeico

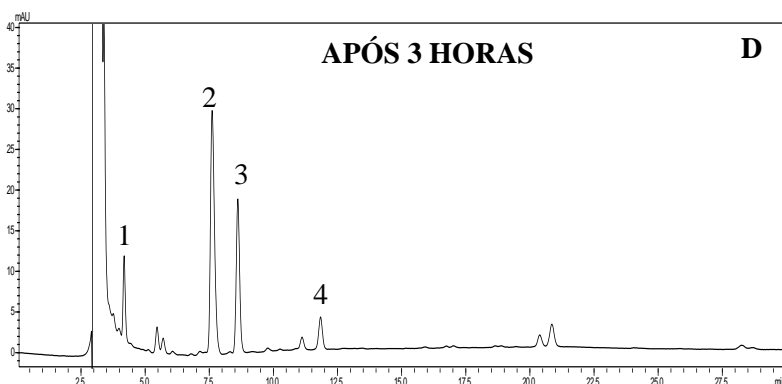
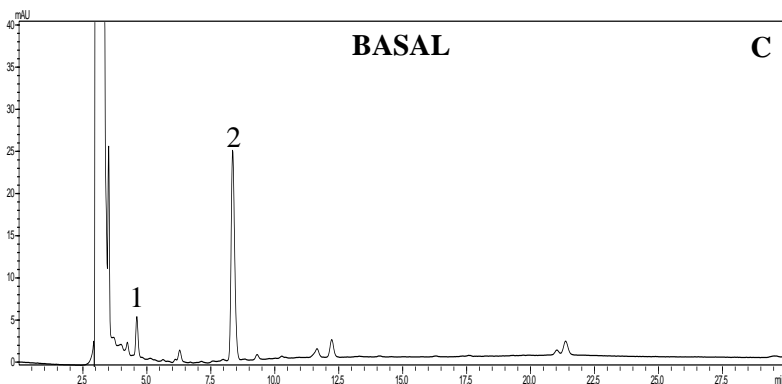
Valores expressos como média  $\pm$  DP

n = número de indivíduos em que foram detectados os respectivos compostos.

O cromatograma comparativo de uma amostra de plasma antes e após o tratamento enzimático está ilustrado na Figura 12. Para o indivíduo exemplificado no cromatograma, foi realizada a média de concentração de todos os tempos do composto M1 nas amostras que não passaram por tratamento enzimático em comparação àquelas que sofreram hidrólise e os valores foram 8,04 e 13,03  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, indicando, assim, aumento desse composto em dois momentos (antes (tempo zero) e após 3 h da ingestão da erva-mate).

**Figura 12** - Cromatogramas representativo da detecção de metilxantinas em amostras de plasma. A e B: amostras sem a hidrólise enzimática; C e D: amostras que passaram por hidrólise enzimática com  $\beta$ -glicuronidase e sulfatase, antes (basal) e após 3 horas da ingestão do ENPEMV ( $\lambda = 280 \text{ nm}$ ).



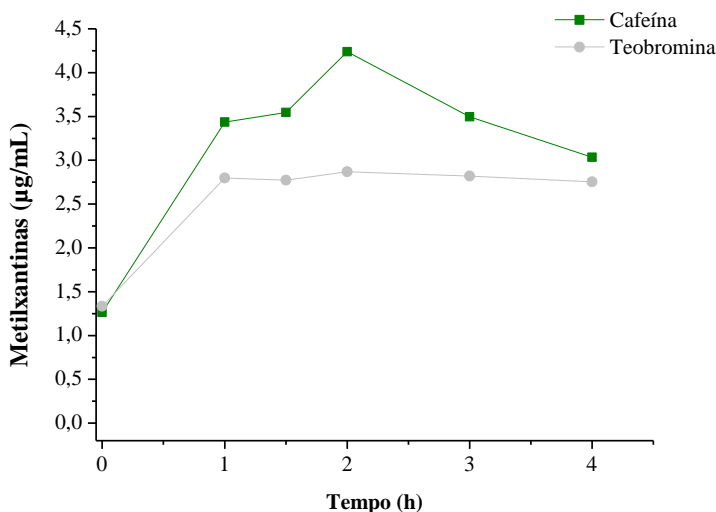


Picos: 1) Teobromina; 2) Cafeína; 3) M1; 4) M2.

Após o consumo da erva-mate, foram identificadas no plasma as metilxantinas cafeína e a teobromina. A cafeína já estava presente no plasma de todos os indivíduos antes da ingestão da bebida e o aumento na concentração plasmática desse composto após a ingestão da bebida, indica a absorção deste composto. Assim como aconteceu com a cafeína, a teobromina foi identificada no plasma de alguns indivíduos após o ingestão do mate. Na figura 13, é possível observar o perfil da média dos oito indivíduos para as metilxantinas. Lang et al. (2013) relataram a presença de cafeína em amostras de plasma após o consumo de café e observaram aumento após a ingestão, assim como aconteceu com a teobromina. Acredita-se que o consumo desses dois compostos na dieta usual poderia explicar a presença dos mesmos antes da ingestão do

extrato de mate, mesmo após os voluntários evitarem o consumo de alimentos ricos nesses compostos por até 10 dias antecedentes ao estudo (CAUBET; COMTE; BRAZIER, 2004; LANG et al., 2013). Em conjunto, os achados descritos pelos autores corroboram os nossos resultados.

**Figura 13** - Perfil da cafeína e da teobromina quantificados no plasma de indivíduos saudáveis após a ingestão de 300 mL de extrato de erva-mate.



Resultados expressos como média (n = 8).

#### 5.4.2 Identificação e quantificação de compostos fenólicos em urina por CLAE

Um total de 13 derivados dos ACGs, principalmente metabólitos, foram detectados na urina de oito voluntários saudáveis após o consumo de erva-mate. A concentração dos compostos detectados nas amostras na forma livre, ou seja, que não passaram por tratamento enzimático está apresentada na Tabela 9. Os valores foram expressos em  $\mu\text{mol/mg}$  creatinina.



Neste estudo, pequenas quantidades de 5-CQA, ácido cafeico, ácido vanílico, M1, M2 e M3 foram detectadas em amostras de urina de diferentes indivíduos no tempo zero, antes do consumo da erva-mate (Tabela 8). Outros autores também encontraram ácidos fenólicos na urina basal de voluntários saudáveis mesmo após restrição alimentar por 24 horas (MONTEIRO et al., 2007; STALMACH et al., 2009) e 48 horas (CREMIN; KASIM-KARAKAS; WATERHOUSE, 2001). Acredita-se que os ácidos monocateoíqunicos sejam rapidamente metabolizados, ou armazenados em órgãos como o fígado, que reforçaria a hipótese da utilização gradual de fenólicos e, depois, excretados em seres humanos (BOOTH, 1957; CREMIN; KASIM-KARAKAS; WATERHOUSE, 2001).

Assim como no plasma, observou-se uma grande variação interpessoal na concentração e no perfil dos compostos fenólicos detectados na urina. Quanto aos ACGs absorvidos intactos, foram identificados os ácidos monocateoíqunicos (3-CQA, 4-CQA ou 5-CQA) em seis indivíduos após o consumo da erva-mate. Em relação aos ácidos diccateoíqunicos, apenas o 3,4-diCQA foi identificado na urina de um indivíduo (Tabela 9). Outros autores detectaram apenas os ácidos cateoíqunicos em amostras de urina após o consumo de ácidos clorogênicos do café (MONTEIRO et al., 2007; FARAH et al., 2008). De forma geral, após a ingestão dos ACGs, as agliconas podem ser absorvidas no intestino, ou podem ser hidrolisadas por enzimas no intestino ou da microbiota do cólon antes de ser absorvidas. Durante a absorção, os ACGs são conjugados no intestino ou, posteriormente, no fígado, de onde são lançados na circulação sanguínea e excretados na bile ou na urina (MANACH et al., 2004).

**Tabela 9** - Concentração urinária dos metabólitos de ácidos clorogênicos detectados sem tratamento enzimático com  $\beta$ -glicuronidase e sulfatase de cada indivíduo após 4 horas do consumo agudo de erva-mate.

Indivíduo	3-CQA	5-CQA	4-CQA	Ácido cafeico	3,5-diCQA	3,4-diCQA	Ácido sinápico	Ácido <i>p</i> -cumárico	Ácido vanílico	M1*	M2*	M3*	Fenólicos Totais
1													
T0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0-2 h	-	-	-	-	-	1,80	-	9,90	-	-	-	-	11,70
2-4 h	-	-	-	-	-	3,40	-	10,07	6,2	1,31	-	-	20,98
2													
T0	-	-	1,14	-	-	-	6,65	-	-	-	-	-	7,79
0-2 h	2,18	1,18	0,41	-	-	-	3,16	-	-	-	-	-	6,93
2-4 h	-	6,68	1,81	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,49
3													
T0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,55	-	-	2,55
0-2 h	-	-	-	-	-	-	-	-	1,86	1,81	0,98	1,37	6,02
2-4 h	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,20	-	0,76	8,96
4													
T0	-	-	-	-	-	-	-	-	4,07	-	-	23,81	27,88
0-2 h	2,24	3,27	3,84	-	-	-	-	6,28	1,34	3,05	1,09	6,48	27,59
2-4 h	-	5,66	6,60	-	-	-	-	7,08	12,96	13,25	3,00	19,21	67,76

Os resultados estão expressos em  $\mu\text{mol/mg}$  creatinina. M1\*, M2\*, M3\*: Metabólitos não identificados e quantificados como equivalentes de ácido 5-cafeoilquínico.

-: Não detectado. Continua na próxima página.

**Tabela 9 – Cont.** - Concentração urinária dos metabólitos de ácidos clorogênicos detectados sem tratamento enzimático com  $\beta$ -glucuronidase e sulfatase de cada indivíduo após 4 horas do consumo agudo de erva-mate.

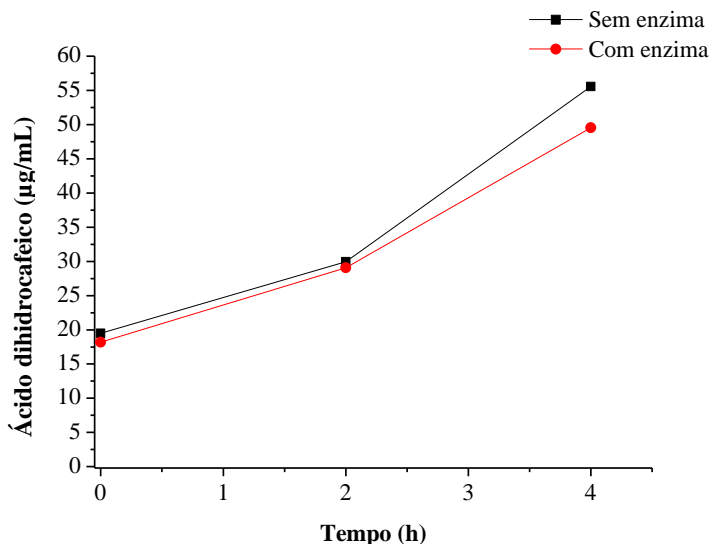
Indivíduo	3-CQA	5-CQA	4-CQA	Ácido cafeico	3,5-diCQA	3,4-diCQA	Ácido sinápico	Ácido <i>p</i> -cumárico	Ácido vanílico	M1*	M2*	M3*	Fenólicos Totais
5													
T0	-	-	-	-	-	-	-	-	0,46	-	-	-	0,46
0-2 h	1,58	2,36	-	-	-	-	-	-	2,29	2,19	-	-	8,42
2-4 h	1,60	2,77	-	-	-	-	-	-	2,04	5,40	-	-	11,81
6													
T0	-	-	-	-	-	-	-	-	3,49	-	-	-	3,49
0-2 h	1,69	2,69	-	-	-	-	-	4,18	2,70	0,95	0,96	0,76	13,93
2-4 h	1,31	1,97	-	-	-	-	-	4,01	3,44	1,73	Nd	Nd	12,46
7													
T0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
0-2 h	2,69	2,99	3,34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21,48
2-4 h	6,65	2,26	2,97	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11,88
8													
T0	-	-	-	-	-	-	-	-	0,64	-	-	-	0,64
0-2 h	2,86	-	1,32	2,08	-	-	-	3,23	4,31	0,93	0,76	0,35	15,84
2-4 h	2,45	-	1,74	2,03	-	-	-	3,80	3,77	0,35	0,22	0,16	14,52

Os resultados estão expressos em  $\mu\text{mol/mg}$  creatinina. M1\*, M2\*, M3\*: Metabólitos não identificados e quantificados como equivalentes de ácido 5-cafeoilquínico.

-. Não detectado.

Em nosso estudo, o DHCA foi o composto fenólico com maior aumento na concentração urinária após o consumo da erva-mate, e por isso os valores foram expressos como média dos oito indivíduos na Figura 14. Igualmente, Monteiro et al. (2007) consideraram o DHCA como o segundo composto mais abundante na urina coletada após a ingestão de ACGs do café.

**Figura 14** - Concentração urinária de ácido dihidrocafeico de oito indivíduos após a ingestão de extrato de erva-mate.

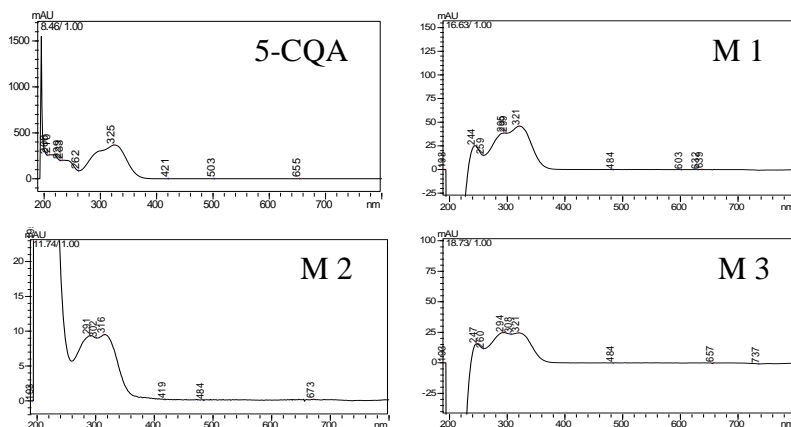


Resultados expressos como média (n = 8).

Na urina dos indivíduos, foram detectados três metabólitos não identificados e que foram quantificados como equivalentes de 5-CQA por apresentarem espectro de absorção semelhante ao mesmo (Figura 15). Além dos três metabólitos (M1, M2 e M3), os outros derivados dos ACGs, como os ácidos *p*-cumárico, sinápico, cafeico e vanílico não estavam presentes nas amostras de plasma coletadas após a ingestão de erva-mate. A presença destes metabólitos urinários após a ingestão do mate demonstram que os ácidos clorogênicos foram absorvidos, metabolizados e excretados. De forma semelhante, Stalmach et al. (2009) observaram diversos metabólitos urinários e que não foram

detectados no plasma ou que estavam presentes em baixas concentrações.

**Figura 15** - Espectro de absorção do ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA) e dos metabólitos urinários não identificados e quantificados em equivalentes de 5-CQA.

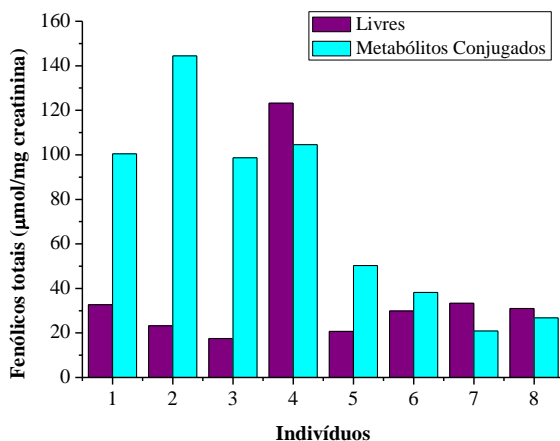


Assim como nas amostras de plasma, pesquisou-se na urina metabólitos que estivessem presentes na forma conjugada. A formação dos metabólitos dos ACGs (conjugados ou não) ocorre no fígado por meio do acoplamento dos compostos com o grupamento sulfato ou com o ácido glicurônico, e esses conjugados são excretados pela urina ou bile, dependendo do metabólito formado (MANACH et al., 1996).

Observou-se aumento na quantidade de ácidos fenólicos excretados pela urina nas amostras que passaram pela hidrólise enzimática, a qual possibilitou a quantificação das formas livres e conjugadas dos metabólitos urinários (Figura 16). O ácido cafeico, um metabólito imediato da absorção dos ACGs, foi detectado na urina de cinco indivíduos, enquanto na forma livre foi detectado em apenas um participante (Tabela 10). Esse resultado corrobora os achados apresentados por Oliveira (2013) onde, dentre os compostos avaliados após a administração de chá mate em ratos, o ácido cafeico foi o composto que apresentou maior conjugação. Além do ácido cafeico, outros metabólitos também tiveram a concentração aumentada após a hidrólise enzimática, ou até mesmo apareceram principalmente nas amostras na forma conjugada, como o ácido sinápico, que manteve o mesmo comportamento do ácido cafeico (presente em um indivíduo na

forma livre e em cinco na forma conjugada), confirmando a hipótese de que os metabólitos conjugados são excretados com mais facilidade do que os ACGs na sua forma intacta. A rápida eliminação dos ácidos fenólicos é facilitada pela conjugação das agliconas ou de suas formas metiladas com grupos sulfato ou glicuronídeos, que aumenta a polaridade da molécula, facilitando a sua excreção renal (SPENCER et al., 2008).

**Figura 16** – Concentração urinária de metabólitos de ácidos fenólicos na forma livre e de metabólitos conjugados, após a ingestão aguda de erva-mate.



**Tabela 10** - Concentração urinária dos metabólitos de ácidos clorogênicos identificados após tratamento enzimático com  $\beta$ -glicuronidase e sulfatase de cada indivíduo após 4 horas do consumo agudo de erva-mate.

Indivíduo	3- CQA	5- CQA	4- CQA	Ácido cafeico	3,5- diCQA	3,4- diCQA	Ácido sinápico	Ácido <i>p</i> - cumárico	Ácido vanílico	M1*	M2*	M3*	Fenólicos Totais
1													
T0	-	-	-	6,71	-	-	-	-	-	-	-	-	6,71
0-2 h	-	-	4,02	2,82	-	16,19	-	9,90	-	-	-	-	32,93
2-4 h	-	2,74	10,41	8,48	7,54	17,42	-	10,07	1,11	1,44	1,64	-	60,85
2													
T0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
0-2 h	-	-	-	-	-	-	11,92	17,99	2,13	-	-	-	32,04
2-4 h	-	5,1	-	-	22,27	-	18	37,77	29,30	-	-	-	112,44
3													
T0	-	-	-	1,42	-	-	-	-	-	-	-	-	50,39
0-2 h	-	1,54	-	2,44	-	-	-	5,78	2,11	0,61	0,87	-	13,35
2-4 h	-	2,78	-	3,98	-	-	-	10,85	13,96	1,58	1,76	-	34,91
4													
T0	-	-	-	3,61	-	-	-	-	-	4,43	0,44	4,18	13,38
0-2 h	1,89	1,60	-	3,49	-	-	13,33	6,31	-	1,19	1,11	1,59	30,51
2-4 h	-	3,47	-	4,44	-	-	36,34	7,13	1,57	4,52	0,41	2,84	60,72

Os resultados estão expressos em  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  creatinina. M1\*, M2\*, M3\*: Metabólitos não identificados e quantificados como equivalentes de ácido 5-cafeoilquinico.

-. Não detectado. Continua na próxima página.

**Tabela 10 - Cont.** - Concentração urinária dos metabólitos de ácidos clorogênicos identificados após tratamento enzimático com  $\beta$ -glucuronidase e sulfatase de cada indivíduo após 4 horas do consumo agudo de erva-mate.

Indivíduo	3-CQA	5-CQA	4-CQA	Ácido cafeico	3,5-diCQA	3,4-diCQA	Ácido sinápico	Ácido <i>p</i> -cumárico	Ácido vanílico	M1*	M2*	M3*	Fenólicos Totais
5													
T0	-	-	-	-	-	-	-	-	2,53	-	-	-	2,53
0-2 h	-	2,21	-	2,62	-	-	20,85	-	2,70	3,07	-	-	31,45
2-4 h	-	1,17	-	1,94	-	-	9,50	-	2,08	1,58	-	-	16,27
6													
T0	-	0,59	-	-	-	-	-	-	2,78	-	-	-	3,37
0-2 h	1,61	1,50	-	2,33	-	-	3,31	4,02	3,06	0,41	4,78	-	21,02
2-4 h	-	1,23	-	2,81	-	-	Nd	3,94	1,96	0,47	3,39	-	13,80
7													
T0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
0-2 h	2,69	2,99	3,34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9,02
2-4 h	6,65	2,26	2,97	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11,88
8													
T0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0-2 h	3,88	2,39	-	-	-	-	2,73	-	-	-	-	3,88	12,88
2-4 h	4,25	2,36	-	-	-	-	3,01	-	-	-	-	4,25	13,87

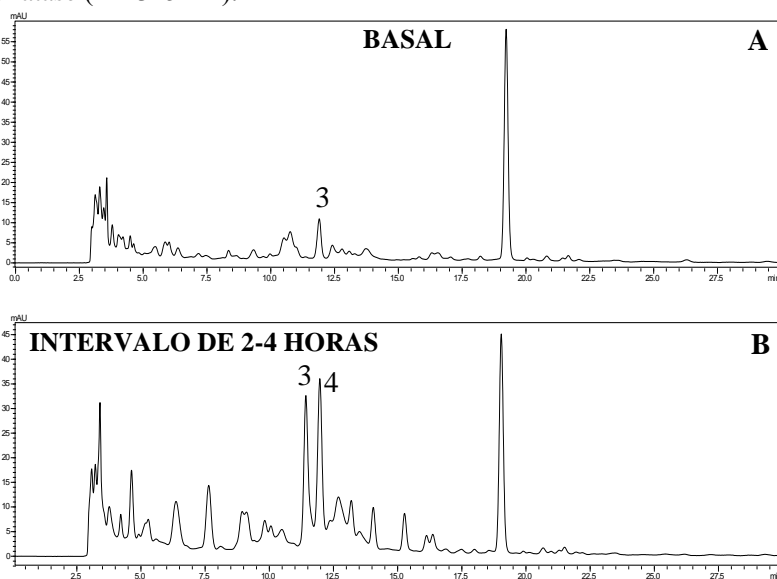
Os resultados estão expressos em  $\mu\text{mol/mg}$  creatinina. M1\*, M2\*, M3\*: Metabólitos não identificados e quantificados como equivalentes de ácido 5-cafeoilquínico.

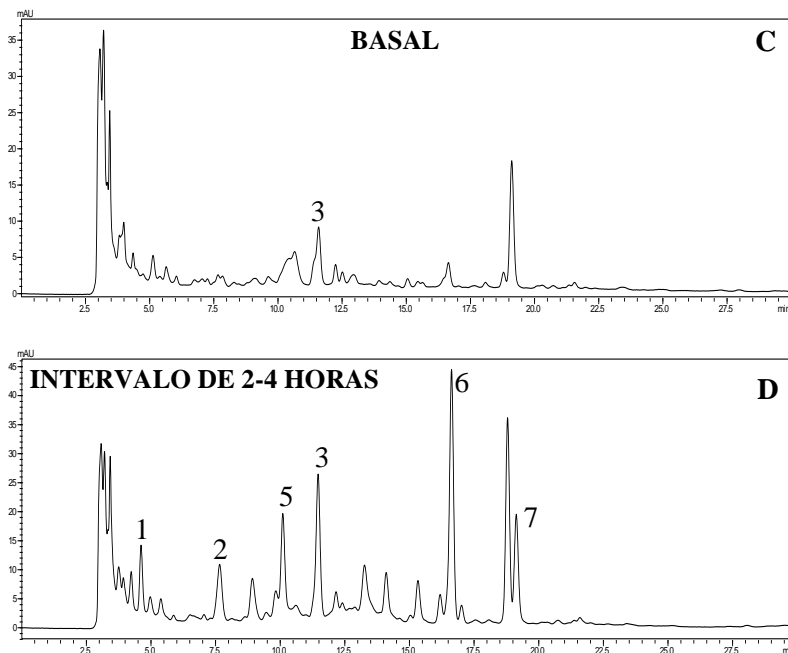
-. Não detectado.



A Figura 17 apresenta o cromatograma de uma amostra de urina antes (tempo zero) e após 4 h da ingestão de erva-mate. Nas amostras que não passaram por hidrólise enzimática, foram detectados o 3-CQA, 5-CQA, ácido vanílico e o M1, após 4 h. É possível observar que, após a hidrólise enzimática, outros compostos, além dos detectados anteriormente, estavam presentes, como os ácidos cafeico e sinápico, e M1 e M3.

**Figura 17** - Cromatograma representativo de compostos fenólicos em amostras de urina obtida antes e no período de 2 a 4 h da ingestão do extrato de erva-mate. A e B: amostras sem a hidrólise enzimática; C e D: amostras que passaram por hidrólise enzimática com  $\beta$ -glicosidase e sulfatase ( $\lambda = 325$  nm).





Picos: 1) 3-CQA; 2) 5-CQA; 3) Ácido vanílico; 4) M1; 5) Ácido cafeico; 6) Ácido sinápico; 7) M3.

Vários fatores podem alterar o grau de conjugação e metabolismo dos ácidos fenólicos e outros compostos bioativos em alimentos em geral, como forma química dos compostos de interesse, tempo de trânsito gastrointestinal, composição da microbiota intestinal, polimorfismos nos genes que expressam as enzimas de fase I e II, dentre outros (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2009).

De forma geral, apesar de o presente estudo fornecer informações sobre o grau de conjugação dos ácidos fenólicos da erva-mate e seus metabólitos, são necessários mais estudos para identificar de forma mais ampla os metabólitos e estabelecer quais formas de fato, são predominantes em seres humanos após o consumo de erva-mate.

### 5.4.2 Identificação e quantificação de metilxantinas em urina por CLAE

Em relação à eliminação das metilxantinas, identificou-se a cafeína na amostra de três voluntários, após incubação com a enzima  $\beta$ -glicuronidase e sulfatase. As concentrações estão apresentadas na Tabela 11 e os cromatogramas na Figura 18.

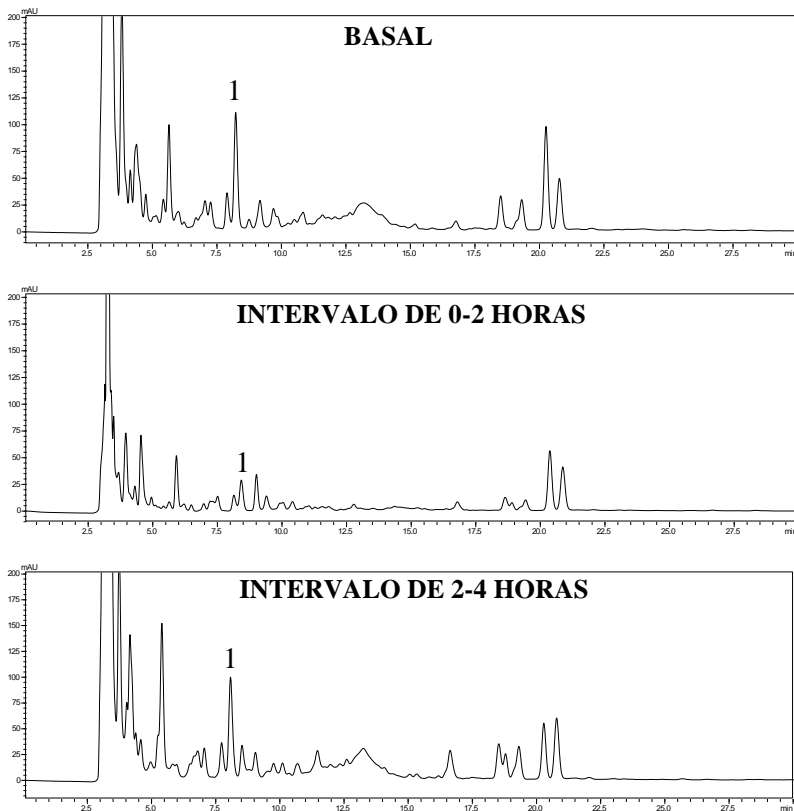
**Tabela 11** - Concentração urinária de cafeína, após tratamento enzimático com  $\beta$ -glicuronidase e sulfatase, identificada em três indivíduos após 4 horas do consumo agudo de erva-mate.

Indivíduos	Cafeína ( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ creatinina)
5	
T0	42,07
0-2 h	6,42
2-4 h	45,17
6	
T0	-
0-2 h	5,27
2-4 h	3,98
7	
T0	-
0-2 h	2,78
2-4 h	10,75

Os resultados estão expressos em  $\mu\text{mol}/\text{mg}$  creatinina.

Não foram encontrados estudos relacionados à absorção de metilxantinas da erva-mate em urina, assim como em nenhuma matriz semelhante, como o café, o que dificulta a interpretação e discussão dos nossos resultados. Entretanto, é possível afirmar que houve aumento na excreção de cafeína em três indivíduos após a ingestão de erva-mate. No indivíduo número 5, a cafeína já estava presente antes da ingestão do extrato de erva-mate, e com base na diminuição na concentração após 2 h e aumento após 4 h, sugere-se que esse aumento seja atribuído à metabolização e excreção da cafeína presente no extrato de erva-mate.

**Figura 18** - Cromatograma representativo da presença de cafeína em uma amostra de urina obtida antes, no período de 0-2 e 2 a 4 h da ingestão do extrato de erva-mate em amostras que passaram por hidrólise enzimática com  $\beta$ -glicuronidase e sulfatase ( $\lambda = 280$  nm).



Pico 1) cafeína

## 6 CONCLUSÃO

Foi possível otimizar um método cromatográfico eficaz para a separação de 15 compostos em 30 min. O uso de HPLC-DAD para a quantificação de diversos marcadores fitoquímicos, como os compostos fenólicos e metilxantinas juntos, podem contribuir com a qualidade na rotina das análises, diminuindo custos e tempo gasto.

As respostas plasmáticas e urinárias, observadas após a ingestão do extrato de erva-mate, demonstraram que os compostos presentes na erva-mate são absorvidos e metabolizados no organismo e excretados tanto na forma livre (agliconas), quanto na forma de ácidos fenólicos livres.

Uma grande variação interpessoal foi observada nos perfis plasmático e urinários entre os indivíduos estudados, dificultando a comparação de dados. Observou-se que os compostos fenólicos são principalmente excretados na urina na forma de metabólitos conjugados.

De forma geral, foi detectado o ácido dihidrocafeico e quatro metabólitos não identificados no plasma dos indivíduos envolvidos na pesquisa, além das metilxantinas cafeína e teobromina. Em relação aos metabólitos urinários foram identificados os ácidos fenólicos 3-CQA, 4-CQA, 5-CQA, 3,5-diCQA, 3,4-diCQA, os ácidos cafeico, dihidrocafeico, sinápico, *p*-cumárico, vanílico, além de três metabólitos desconhecidos com espectro semelhante àqueles dos ácidos clorogênicos. Do grupo das metilxantinas, foi identificada apenas a cafeína.

O ácido dihidrocafeico esteve presente em concentração aumentada no plasma de alguns indivíduos após a ingestão do mate, sugerindo assim a metabolização dos compostos fenólicos encontrados na erva-mate ingerida pelos participantes.

A cafeína esteve presente em concentração aumentada no plasma de todos os indivíduos após a ingestão de erva-mate e na urina foi identificada em três indivíduos após a incubação com a enzima  $\beta$ -glicuronidase e sulfatase.

Pesquisas utilizando outras ferramentas, como a espectrometria de massas, serão necessárias para identificar todos os compostos detectados e, dessa forma, obter maiores informações sobre a absorção e metabolismo dos ácidos clorogênicos e metilxantinas da erva-mate em seres humanos.



## REFERÊNCIAS

- ALIKARIDIS, F. Natural constituents of *Ilex* species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 20, n. 2, p. 121–44, 1987.
- ANDRADE, F. **Estudo toxicológico e análise da estabilidade térmica do extrato nebulizado de erva-mate**. 2011. Universidade Federal de Santa Catarina, 2011.
- ANESINI, C.; TURNER, S.; COGOI, L.; FILIP, R. Study of the participation of caffeine and polyphenols on the overall antioxidant activity of mate (*Ilex paraguariensis*). **LWT - Food Science and Technology**, v. 45, n. 2, p. 299–304, 2012.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.
- ANTONI, V. L. **A estrutura competitiva da indústria ervateira do rio grande do sul**. 1995. UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, 1995.
- ANVISA 2003. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – nº 899 - **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**, de 29/05/2003. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF.
- ARÇARI, D. P.; SANTOS, J. C.; GAMBERO, A.; RIBEIRO, M. L. The in vitro and in vivo effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract on adipogenesis. **Food Chemistry**, v. 141, n. 2, p. 809–15, 2013.
- ATHAYDE, M. L.; COELHO, G. C.; SCHENKEL, E. P. Caffeine and theobromine in epicuticular wax of *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. **Phytochemistry**, v. 55, n. 7, p. 853–857, 2000.
- AZUMA, K.; IPPOUSHI, K.; NAKAYAMA, M.; ITO, H.; HIGASHIO, H.; TERAOKA, J. Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration. **Journal Of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 11, p. 5496–5500, 2000.
- BAISCH, A. L. M.; URBAN, H.; RUIZ, A. N. Endothelium-dependent vasorelaxing activity of aqueous extracts of lyophilized seeds of

*Casimiroa edulis* (AECe) on rat mesenteric arterial bed. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, n. 2–3, p. 163–167, 2004.

BASTOS, D. H. M.; FORNARI, A. C.; QUEIROZ, Y. S.; TORRES, E. A. F. S. Bioactive Compounds Content of Chimarrão Infusions Related to the Moisture of Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) Leaves. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 3, p. 399–404, 2006.

BASTOS, D. H. M.; OLIVEIRA, D. M.; MATSUMOTO, R. L. T.; CARVALHO, P. O.; RIBEIRO, M. L. Yerba maté: Pharmacological Properties, Research and Biotechnology. **Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 37–46, 2007a.

BASTOS, D. H. M.; ROGERO, M. M.; ARÊAS, J. A. G. Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 5, 2009.

BASTOS, D. H. M.; SALDANHA, L. A.; CATHARINO, R. R.; SAWAYA, A. C. H. F.; CUNHA, I. B. S.; CARVALHO, P. O.; EBERLIN, M. N. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from yerba maté (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camelia sinensis*) extracts. **Molecules**, v. 12, n. 3, p. 423–432, 2007b.

BASTOS DE MARIA, C. A.; MOREIRA, R. F. a. Métodos para análise de ácido clorogênico. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 586–592, 2004.

BECKER, A. M. Erva-mate (*Ilex paraguariensis*, st hil.) em cápsulas: estudos de toxicidade clínica e efeitos hipocolesterolêmico e antioxidante em indivíduos com dislipidemias. 2013. (Dissertação). Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, 2013.

BELZA, A; TOUBRO, S.; ASTRUP, A. The effect of caffeine, green tea and tyrosine on thermogenesis and energy intake. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 63, n. 1, p. 57–64, 2009.

BERTÉ, K. a S.; BEUX, M. R.; SPADA, P. K. W. D. S.; SALVADOR, M.; HOFFMANN-RIBANI, R. Chemical composition and antioxidant activity of yerba-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil., Aquifoliaceae)



extract as obtained by spray drying. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 5523–5527, 2011.

BOADO, L. S.; FRETES, R. M.; BRUMOVSKY, L. A. Bioavailability and antioxidant effect of the *Ilex paraguariensis* polyphenols. **Nutrition & Food Science**, v. 45, p. 326–335, 2015.

BOAVENTURA, B. C. B.; DI PIETRO, P. F.; STEFANUTO, A.; KLEIN, G. A.; DE MORAIS, E. C.; DE ANDRADE, F.; WAZLAWIK, E.; DA SILVA, E. L. Association of mate tea (*Ilex paraguariensis*) intake and dietary intervention and effects on oxidative stress biomarkers of dyslipidemic subjects. **Nutrition**, v. 28, n. 6, p. 657–664, 2012.

BOJIC, M.; HAAS, V. S.; ŠARIT, D.; MALEŠ, Z. Determination of Flavonoids , Phenolic Acids , and Xanthines in Mate Tea ( *Ilex paraguariensis* St . -Hil .). **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2013, 2013.

BOOTH, O. H. Urinary metabolites chlorogenic. **The Journal of Biological Chemistry**, n. 7, 1957.

BRACESCO, N.; SANCHEZ, A. G.; CONTRERAS, V.; MENINI, T.; GUGLIUCCI, A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, n. 3, p. 378–384, 2011.

BURRIS, K. P.; DAVIDSON, P. M.; STEWART, C. N.; HARTE, F. M. Antimicrobial Activity of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) Aqueous Extracts against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 6, p. 456–462, 2011.

BURRIS, K. P.; DAVIDSON, P. M.; STEWART, C. N.; ZIVANOVIC, S.; HARTE, F. M. Aqueous extracts of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) as a natural antimicrobial against *Escherichia coli* O157:H7 in a microbiological medium and pH 6.0 apple juice. **Journal of Food Protection**, v. 75, n. 4, p. 753–7, 2012.

BUTIUK, A. P.; MARTOS, M. A.; ADACHI, O.; HOURS, R. A. Study of the chlorogenic acid content in yerba mate (*Ilex paraguariensis* St.

Hil.): Effect of plant fraction, processing step and harvesting season. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, 2016.

CARDOZO, E. L.; FERRARESE-FILHO, O.; FILHO, L. C.; FERRARESE, M. D. L. L.; DONADUZZI, C. M.; STURION, J. A. Methylxanthines and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) progenies grown in Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, n. 7, p. 553–558, 2007.

CAUBET, M. S.; COMTE, B.; BRAZIER, J. L. Determination of urinary <sup>13</sup>C-caffeine metabolites by liquid chromatography-mass spectrometry: The use of metabolic ratios to assess CYP1A2 activity. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 34, n. 2, p. 379–389, 2004.

CHEYNIER, V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. **The American Journal Clinical Nutrition**, v. 81, n. 1, p. 223S–229, 2005.

CHOUDHURY, R.; SRAI, S. K.; DEBNAM, E.; RICE-EVANS, C. A. Urinary excretion of hydroxycinnamates and flavonoids after oral and intravenous administration. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 3-4, p. 278–286, 1999.

CLIFFORD, M. Characterisation of chlorogenic acids by simultaneous isomerisation and transesterification with tetramethylammonium hydroxide. **Food Chemistry**, v. 33, n. 2, p. 115–123, 1989.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, n. 3, p. 362–372, 1999.

CLIFFORD, M. N.; JOHNSTON, K. L.; KNIGHT, S.; KUHNERT, N. Hierarchical scheme for LC-MS<sup>n</sup> identification of chlorogenic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 1, p. 2900–2911, 2003.

COGOI, L.; GIACOMINO, M. S.; PELLEGRINO, N.; ANESINI, C.; FILIP, R. Nutritional and Phytochemical Study of *Ilex paraguariensis*

Fruits, **Journal of Chemistry**, v. 2013, 2013.

CREMIN, P.; KASIM-KARAKAS, S.; WATERHOUSE, a L. LC/ES-MS detection of hydroxycinnamates in human plasma and urine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 4, p. 1747–50, 2001.

CROWE, F. L.; RODDAM, A. W.; KEY, T. J.; APPLEBY, P. N.; OVERVAD, K.; JAKOBSEN, M. U.; TJONNELAND, A.; HANSEN, L.; BOEING, H.; WEIKERT, C.; LINSEISEN, J.; KAAKS, R.; TRICHOPOULOU, A.; MISIRLI, G.; LAGIOU, P.; SACERDOTE, C.; PALA, V.; PALLI, D.; TUMINO, R.; PANICO, S.; BUENO-DE-MESQUITA, H. B.; BOER, J.; VAN GILS, C. H.; BEULENS, J. W. J.; BARRICARTE, A.; RODRIGUEZ, L.; LARRANAGA, N.; SANCHEZ, M.-J.; TORMO, M.-J.; BUCKLAND, G.; LUND, E.; HEDBLAD, B.; MELANDER, O.; JANSSON, J.-H.; WENNBERG, P.; WAREHAM, N. J.; SLIMANI, N.; ROMIEU, I.; JENAB, M.; DANESH, J.; GALLO, V.; NORAT, T.; RIBOLI, E. Fruit and vegetable intake and mortality from ischaemic heart disease: results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Heart study. **European Heart Journal**, v. 32, n. 10, p. 1235–1243, 2011.

CROZIER, A.; DEL RIO, D.; CLIFFORD, M. N. Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 31, n. 6, p. 446–467, 2010.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Product Reports**, v. 26, n. 8, p. 1001, 2009.

CRUZ, F. A. **Identificação dos ácidos ursólico e oleanólico no plasma de indivíduos saudáveis após a ingestão aguda de erva-mate (*Ilex paraguariensis*, A. St.-Hil.)**. 2016. (Dissertação). Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, 2016.

D'ARCHIVIO, M.; FILESI, C.; DI BENEDETTO, R.; GARGIULO, R.; GIOVANNINI, C.; MASELLA, R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanita**, v. 43, p. 348–361, 2007.

DA SILVA, E. L.; NEIVA, T. J. C.; SHIRAI, M.; TERAOKA, J.; ABDALLA, D. S. P. Acute ingestion of yerba mate infusion (*Ilex paraguariensis*) inhibits plasma and lipoprotein oxidation. **Food Research International**, v. 41, n. 10, p. 973–979, 2008.

DAHMER, T.; BERGER, M.; BARLETTE, A. G.; RECK, J.; SEGALIN, J.; VERZA, S.; ORTEGA, G. G.; GNOATTO, S. C. B.; GUIMARÃES, J. A.; VERLI, H.; GOSMANN, G. Antithrombotic effect of chikusetsusaponin IVa isolated from *Ilex paraguariensis* (Maté). **Journal of medicinal food**, v. 15, n. 12, p. 1073–80, 2012.

DE MEJÍA, E. G.; SONG, Y. S.; HECK, C. I.; RAMÍREZ-MARES, M. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): Phenolics, antioxidant capacity and in vitro inhibition of colon cancer cell proliferation. **Journal of Functional Foods**, v. 2, n. 1, p. 23–34, jan. 2010.

DE MORAIS, E. C., et al. Consumption of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dyslipidemic subjects and provides an additional LDL-cholesterol reduction in individuals on statin therapy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 18, p. 8316–8324, 2009.

DE OLIVEIRA, D. M.; BASTOS, D. H. M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 1051–1056, 2011.

DEL RIO, D.; COSTA, L. G.; LEAN, M. E. J.; CROZIER, A. Polyphenols and health: What compounds are involved? **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 20, n. 1, p. 1–6, 2010.

DEL RIO, D.; RODRIGUEZ-MATEOS, A.; SPENCER, J. P. E.; TOGNOLINI, M.; BORGES, G.; CROZIER, A. Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 18, n. 14, p. 1818–1892, 2013.

DUARTE, G. S.; FARAH, A. Effect of simultaneous consumption of milk and coffee on chlorogenic acids' bioavailability in humans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 7925–7931, 2011.

ESMELINDRO, M. C.; TONIAZZO, G.; WACZUK, A.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, D. De. Caracterização físico-química da erva mate: influência das etapas do processamento industrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 2, p. 199–204, 2002.

FARAH, A.; DE PAULIS, T.; TRUGO, L. C.; MARTIN, P. R. Effect of roasting on the formation of chlorogenic acid lactones in coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 5, p. 1505–1513, 2005.

FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 1, p. 23–36, 2006.

FARAH, A.; MONTEIRO, M.; DONANGELO, C. M.; LAFAY, S. Chlorogenic Acids from Green Coffee Extract are Highly Bioavailable in Humans. **Journal of Nutrition**, v. 138, p. 2309–2315, 2008.

FERNANDES, E. S.; DE OLIVEIRA MACHADO, M.; BECKER, A. M.; DE ANDRADE, F.; MARASCHIN, M.; DA SILVA, E. L. Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) enhances the gene modulation and activity of paraoxonase-2: In vitro and in vivo studies. **Nutrition**, v. 28, n. 11-12, p. 1157–1164, 2012.

FERREIRA, F.; VÁZQUEZ, A.; GÜNTNER, C.; MOYNA, P. Inhibition of the passive diffusion of cholic acid by the *Ilex paraguariensis* St. Hil. saponins. **Phytotherapy Research**, v. 11, n. 1, p. 79–81, 1997.

FILIP, R.; LOTITO, S.; FERRARO, G.; FRAGA, C. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. **Nutrition research**, v. 20, n. 10, p. 1437–1446, 2000.

FORMAN, H. J.; DAVIES, K. J. A.; URSINI, F. How do nutritional antioxidants really work: Nucleophilic tone and para-hormesis versus free radical scavenging in vivo. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 66, p. 24–35, 2014.

GAO, H.; LIU, Z.; QU, X.; ZHAO, Y. Effects of Yerba Mate tea (*Ilex paraguariensis*) on vascular endothelial function and liver lipoprotein

receptor gene expression in hyperlipidemic rats. **Fitoterapia**, v. 84, n. 1, p. 264–272, 2013.

GNOATTO, S. C. B.; SCHENKEL, E. P.; BASSANI, V. L. HPLC method to assay total saponins in *Ilex paraguariensis* aqueous extract. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 4, p. 723–726, 2005.

GONTHIER, M.-P.; VERNY, M.-A.; BESSON, C.; RÉMÉSY, C.; SCALBERT, A. Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. **The Journal of nutrition**, v. 133, n. 6, p. 1853–1859, 2003.

GOSMANN, G.; GUILLAUME, D.; TAKETA, A. T. C.; SCHENKEL, E. P. Triterpenoid saponins from *Ilex paraguariensis*. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 3, p. 438–441, 1995.

GUGLIUCCI, a.; BASTOS, D. H. M.; SCHULZE, J.; SOUZA, M. F. F. Caffeic and chlorogenic acids in *Ilex paraguariensis* extracts are the main inhibitors of AGE generation by methylglyoxal in model proteins. **Fitoterapia**, v. 80, n. 6, p. 339–344, 2009.

GUGLIUCCI, A. Antioxidant Effects of *Ilex paraguariensis* : Induction of Decreased Oxidability of Human LDL *in Vivo*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 344, n. 224, p. 338–344, 1996.

GUGLIUCCI, A.; BASTOS, D. H. M. Chlorogenic acid protects paraoxonase 1 activity in high density lipoprotein from inactivation caused by physiological concentrations of hypochlorite. **Fitoterapia**, v. 80, n. 2, p. 138–142, 2009.

HECK, C. I.; DE MEJIA, E. G. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. R138–51, 2007.

HEINRICHS, R.; MALAVOLTA, E. Composição mineral do produto comercial da erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). **Ciência Rural**, v. 31, n. 5, p. 781–785, 2001.

HELENO, S. A.; MARTINS, A.; QUEIROZ, M. J. R. P.; FERREIRA, I. C. F. R. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. **Food Chemistry**, v. 173, p. 501–513, 2015.

ICH. **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology - Q2(R1)**. The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH), 2005.

ITO, E.; CROZIER, A.; ASHIHARA, H. Theophylline metabolism in higher plants. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1336, n. 2, p. 323–30, 1997.

JACOB, P. S. **Efeito da erva-mate ( *Ilex paraguariensis* ) sobre a resposta inflamatória e via de sinalização da insulina no fígado de ratos**. 2012. (Dissertação). Programa de Pós-Graduação em Nutrição em Saúde Pública, Universidade de São Paulo Faculdade de Saúde Pública, São Paulo. 2012.

KANG, Y.-R.; LEE, H.-Y.; KIM, J.-H.; MOON, D.-I.; SEO, M.-Y.; PARK, S.-H.; CHOI, K.-H.; KIM, C.-R.; KIM, S.-H.; OH, J.-H.; CHO, S.-W.; KIM, S.-Y.; KIM, M.-G.; CHAE, S.-W.; KIM, O.; OH, H.-G. Anti-obesity and anti-diabetic effects of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. **Laboratory Animal Research**, v. 28, n. 1, p. 23–9, 2012.

KISS, T. COMPLEXES OF 3 , 4-DIHYDROXYPHENYL COPPER ( II ) COMPLEXES OF CHLOROGENIC ACID AND RELATED COMPOUNDS. v. 8, n. 19, 1989.

KITATANI, T.; WATANABE, Y.; SHIBUYA, T. Different effects of methylxanthines on central serotonergic postsynaptic neurons in a mouse behavioral model. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, v. 44, n. 2, p. 457–61, 1993.

KLEIN, G. A.; STEFANUTO, A.; BOAVENTURA, B. C. .; DE MORAIS, E. C.; CAVALCANTE, L. da S.; DE ANDRADE, F.; WAZLAWIK, E.; DI PIETRO, P. F.; MARASCHIN, M.; DA SILVA, E. L. Mate Tea (*Ilex paraguariensis*) Improves Glycemic and Lipid

Profiles of Type 2 Diabetes and Pre-Diabetes Individuals: A Pilot Study. **The Journal of the American College of Nutrition**, v. 30, n. 5, p. 320–332, 2011.

KOCH, W.; BAJ, T.; KUKULA-KOCH, W.; MARZEC, Z.; ACCESS, O. Dietary intake of specific phenolic compounds and their effect on the antioxidant activity of daily food rations. p. 869–876, 2015.

KONO, Y.; KOBAYASHI, K.; TAGAWA, S.; ADACHI, K.; UEDA, A.; SAWA, Y.; SHIBATA, H. Antioxidant activity of polyphenolics in diets. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1335, n. 3, p. 335–342, 1997.

KRAEMER, K. H.; TAKETA, a. T. C.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; GUILLAUME, D. Matesaponin 5, a highly polar saponin from *Ilex paraguariensis*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 4, p. 1119–1122, 1996.

KROON, P. a.; CLIFFORD, M. N.; CROZIER, A.; DAY, A. J.; DONOVAN, J. L.; MANACH, C.; WILLIAMSON, G. How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro? **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 80, n. 1, p. 15–21, 2004.

LAFAY, S.; GIL-IZQUIERDO, A.; MANACH, C.; MORAND, C.; BESSON, C.; SCALBERT, A. Chlorogenic acid is absorbed in its intact form in the stomach of rats. **The Journal of Nutrition**, v. 136, n. 5, p. 1192–1197, 2006.

LANG, R.; DIEMINGER, N.; BEUSCH, A.; LEE, Y. M.; DUNKEL, A.; SUESS, B.; SKURK, T.; WAHL, A.; HAUNER, H.; HOFMANN, T. Bioappearance and pharmacokinetics of bioactives upon coffee consumption. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 26, p. 8487–8503, 2013.

LANZETTI, M.; BEZERRA, F. S.; ROMANA-SOUZA, B.; BRANDO-LIMA, A. C.; KOATZ, V. L. G.; PORTO, L. C.; VALENCA, S. S. Mate tea reduced acute lung inflammation in mice exposed to cigarette smoke. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, v. 24, n. 4, p. 375–81, 2008.



LANZETTI, M.; PIRES, K. M. P.; SANTOS, J. C.; RIBEIRO, M. L.; BORGES, R. M.; DA SILVA, A. J. R.; PORTO, L. C.; BENJAMIM, C. F.; VALENCA, S. S. Ready-to-drink Matte® tea (diet and regular) increased life span and pulmonary health in aged mice. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 675–682, 2013.

CARDOZO JUNIOR, E. L.; MORAND, C. Interest of mate ( *Ilex paraguariensis* A. St. -Hil.) as a new natural functional food to preserve human cardiovascular health – A review. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 440–454, 2016.

LORIA, D.; BARRIOS, E.; ZANETTI, R. Cancer and yerba mate consumption: a review of possible associations. **Pan American Journal of Public Health**, v. 25, n. 6, p. 530–539, 2009.

LÜCKEMEYER, D. D.; MÜLLER, V. D. M.; MORITZ, M. I. G.; STOCO, P. H.; SCHENKEL, E. P.; BARARDI, C. R. M.; REGINATTO, F. H.; SIMÕES, C. M. O. Effects of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (yerba mate) on herpes simplex virus types 1 and 2 replication. **Phytotherapy Research**, v. 26, n. 4, p. 535–540, 2012.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: Food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727–747, 2004.

MARTIN, J. G. P.; PORTO, E.; ALENCAR, S. M. De; GLÓRIA, E. M.; CORRÊA, C. B.; CABRAL, I. S. R. Antimicrobial activity of yerba mate ( *Ilex paraguariensis* St. Hil.) against food pathogens. **Revista Argentina de Microbiologia**, v. 45, n. 2, p. 93–98, 2013.

MATEOS, R.; GOYA, L.; BRAVO, L. Uptake and metabolism of hydroxycinnamic acids (chlorogenic, caffeic, and ferulic acids) by HepG2 cells as a model of the human liver. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 23, p. 8724–8732, 2006.

MEINHART, A. D.; BIZZOTTO, C. S.; BALLUS, C. A.; POLONI RYBKA, A. C.; SOBRINHO, M. R.; CERRO-QUINTANA, R. S.; TEIXEIRA-FILHO, J.; GODOY, H. T. Methylxanthines and phenolics content extracted during the consumption of mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.

58, n. 4, p. 2188–2193, 2010.

MENG, S.; CAO, J.; FENG, Q.; PENG, J.; HU, Y. Roles of chlorogenic acid on regulating glucose and lipids metabolism: A review. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1–12, 2013.

MEYER, A. S.; HEINONEN, M.; FRANKEL, E. N. Antioxidant interactions of catechin, cyanidin, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation. **Food Chemistry**, v. 61, n. 1-2, p. 71–75, 1998.

MONTEIRO, M. C.; FARAH, A.; PERRONE, D.; CARLOS, L.; DONANGELO, C. M. Perfil farmacocinético de ácidos clorogênicos majoritários e metabólitos em plasma e urina de humanos após ingestão de café. Disponível em: <http://www.sbicafe.ufv.br/handle/123456789/2231>

MONTEIRO, M.; FARAH, A.; PERRONE, D.; TRUGO, L. C.; DONANGELO, C. Chlorogenic acid compounds from coffee are differentially absorbed and metabolized in humans. **The Journal of Nutrition**, v. 137, n. 10, p. 2196–2201, 2007.

NAKAMURA, K. L.; LARA, E.; JUNIOR, C.; DONADUZZI, C. M.; SCHUSTER, I. Genetic variation of phytochemical compounds in progenies of *Ilex paraguariensis* St . Hil . **Biotechnology**, p. 116–123, 2009.

NARDINI, M.; CIRILLO, E.; NATELLA, F.; SCACCINI, C. Absorption of phenolic acids in humans after coffee consumption. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 20, p. 5735–5741, 2002.

OHNISHI, M.; MORISHITA, H.; IWAHASHI, H.; TODA, S.; SHIRATAKI, Y.; KIMURA, M.; KIDO, R. Inhibitory Effects Of Chlorogenic Acids On Linoleic-Acid Peroxidation And Hemolysis. **Phytochemistry**, v. 36, n. 3, p. 579–583, 1994.

OLIVEIRA, D. M. de. **Estudo da biodisponibilidade de compostos fenólicos do chá mate ( *Ilex paraguariensis* )**. 2013. (Tese). Programa

de Pós-Graduação de Nutrição em Saúde Pública, Universidade de São Paulo, 2013.

OLTHOF, M. R.; HOLLMAN, P. C. H.; BUIJSMAN, M. N. C. P.; VAN AMELSVOORT, J. M. M.; KATAN, M. B. Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. **The Journal of Nutrition**, v. 133, n. 6, p. 1806–1814, 2003.

OLTHOF, M. R.; HOLLMAN, P. C.; KATAN, M. B. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. **The Journal of Nutrition**, v. 131, n. 1, p. 66–71, 2001.

ONG, K. W.; HSU, A.; TAN, B. K. H. Anti-diabetic and anti-lipidemic effects of chlorogenic acid are mediated by ampk activation. **Biochemical Pharmacology**, v. 85, n. 9, p. 1341–51, 2013.

PANZA, V. S. P.; WAZLAWIK, E.; RICARDO SCH??TZ, G.; COMIN, L.; HECHT, K. C.; DA SILVA, E. L. Consumption of green tea favorably affects oxidative stress markers in weight-trained men. **Nutrition**, v. 24, n. 5, p. 433–442, 2008.

PARI, L.; KARTHIKESAN, K.; MENON, V. P. Comparative and combined effect of chlorogenic acid and tetrahydrocurcumin on antioxidant disparities in chemical induced experimental diabetes. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 341, n. 1-2, p. 109–17, 2010.

PENG, B. J.; ZHU, Q.; ZHONG, Y. L.; XU, S. H.; WANG, Z. Chlorogenic Acid Maintains Glucose Homeostasis through Modulating the Expression of SGLT-1, GLUT-2, and PLG in Different Intestinal Segments of Sprague-Dawley Rats Fed a High-Fat Diet. **Biomedical and Environmental Sciences: BES**, v. 28, n. 12, p. 894–903, dez. 2015.

PEREIRA, D. F.; KAPPEL, V. D.; CAZAROLLI, L. H.; BOLIGON, a. a.; ATHAYDE, M. L.; GUESSER, S. M.; DA SILVA, E. L.; SILVA, F. R. M. B. Influence of the traditional Brazilian drink *Ilex paraguariensis* tea on glucose homeostasis. **Phytomedicine**, v. 19, n. 10, p. 868–877, 2012.

PERES, R. G.; TONIN, F. G.; TAVARES, M. F. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. HPLC-DAD-ESI/MS identification and quantification of phenolic compounds in *Ilex paraguariensis* beverages and on-line evaluation of individual antioxidant activity. **Molecules**, v. 18, n. 4, p. 3859–3871, 2013.

PIAZZON, a; VRHOVSEK, U.; MASUERO, D.; MATTIVI, F.; MANDOJ, F.; NARDINI, M. Antioxidant activity of phenolic acids and their metabolites: synthesis and antioxidant properties of the sulfate derivatives of ferulic and caffeic acids and of the acyl glucuronide of ferulic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 50, p. 12312–23, 2012.

PIMENTEL, G. D.; LIRA, F. S.; ROSA, J. C.; CARIS, A. V.; PINHEIRO, F.; RIBEIRO, E. B.; OLLER DO NASCIMENTO, C. M.; OYAMA, L. M. Yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) attenuates both central and peripheral inflammatory effects of diet-induced obesity in rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 5, p. 809–818, 2013.

PINTO, R. M. C.; , BRUNA M. LEMESA, A. A. F. Z.; KLEINA, T.; , FERNADO DE PAULAC , AIRTON KISTD, A. S. F.; MARQUESE; , ALESSANDRO NOGUEIRAB, I. M. D. and F. L. B. Detection and quantification of phytochemical markers of *Ilex paraguariensis* by liquid chromatography. **Química Nova**, v. 38, n. 9, p. 1219–1225, 2015.

POQUET, L.; CLIFFORD, M. N.; WILLIAMSON, G. Transport and Metabolism of Ferulic Acid. **Pharmacology**, v. 36, n. 1, p. 190–197, 2007.

PRUDÊNCIO, A. P. A.; PRUDÊNCIO, E. S.; AMBONI, R. D. M. C.; MURAKAMI, A. N. N.; MARASCHIN, M.; PETRUS, J. C. C.; OGLIARI, P. J.; LEITE, R. S. Phenolic composition and antioxidant activity of the aqueous extract of bark from residues from mate tree (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) bark harvesting concentrated by nanofiltration. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 3, p. 399–405, 2012.

PUANGPRAPHANT, S.; BERHOW, M. a.; VERMILLION, K.; POTTS, G.; GONZALEZ DE MEJIA, E. Dicafeoylquinic acids in Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire) inhibit NF-??B nucleus

translocation in macrophages and induce apoptosis by activating caspases-8 and -3 in human colon cancer cells. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 55, n. 10, p. 1509–1522, 2011.

RECHNER, A. R.; KUHNLE, G.; BREMNER, P.; HUBBARD, G. P.; MOORE, K. P.; RICE-EVANS, C. a. The metabolic fate of dietary polyphenols in humans. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 2, p. 220–235, 2002.

RECHNER, A. R.; SMITH, M. a.; KUHNLE, G.; GIBSON, G. R.; DEBNAM, E. S.; SRAI, S. K. S.; MOORE, K. P.; RICE-EVANS, C. a. Colonic metabolism of dietary polyphenols: Influence of structure on microbial fermentation products. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 36, n. 2, p. 212–225, 2004.

REDEUIL, K.; SMARRITO-MENOZZI, C.; GUY, P.; REZZI, S.; DIONISI, F.; WILLIAMSON, G.; NAGY, K.; RENOUF, M. Identification of novel circulating coffee metabolites in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 29, p. 4678–4688, 2011.

RENOUF, M.; GUY, P. a; MARMET, C.; FRAERING, A.-L.; LONGET, K.; MOULIN, J.; ENSLEN, M.; BARRON, D.; DIONISI, F.; CAVIN, C.; WILLIAMSON, G.; STEILING, H. Measurement of caffeic and ferulic acid equivalents in plasma after coffee consumption: small intestine and colon are key sites for coffee metabolism. **Molecular nutrition & food research**, v. 54, n. 6, p. 760–6, 2010.

RENOUF, M.; MARMET, C.; GIUFFRIDA, F.; LEPAGE, M.; BARRON, D.; BEAUMONT, M.; WILLIAMSON, G.; DIONISI, F. Dose-response plasma appearance of coffee chlorogenic and phenolic acids in adults. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 58, n. 2, p. 301–309, 2014.

RESENDE, P. E. De; VERZA, S. G.; KAISER, S.; GOMES, L. F.; KUCHARSKI, L. C.; ORTEGA, G. G. The activity of mate saponins (*Ilex paraguariensis*) in intra-abdominal and epididymal fat, and glucose oxidation in male Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, n. 3, p. 735–740, 2012.

RESENDE, M. D. V.; STURION, J. A.; CARVALHO, A. P.; SIMEÃO, R. M.; FERNANDES, J. Programa de melhoramento da Erva-Mate coordenado pela EMBRAPA - Resultados da avaliação genética de populações, progênes, indivíduos e clones. **Colombo: Embrapa Florestas**, v. 43, p. 65, 2000.

RIVELLI, D. P.; ALMEIDA, R. L.; ROPKE, C. D.; BARROS, S. B. M. Hydrolysis influence on phytochemical composition, antioxidant activity, plasma concentration, and tissue distribution of hydroethanolic *Ilex paraguariensis* extract components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 16, p. 8901–8907, 2011.

ROMMEL, A.; WROLSTAD, R. E. Influence of acid and base hydrolysis on the phenolic composition of red raspberry juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, n. 8, p. 1237–1241, 1993.

RONDINI, L.; PEYRAT-MAILLARD, M. N.; MARSSET-BAGLIERI, A.; FROMENTIN, G.; DURAND, P.; TOMÉ, D.; PROST, M.; BERSET, C. Bound ferulic acid from bran is more bioavailable than the free compound in rat. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 13, p. 4338–4343, 2004.

SATO, Y.; ITAGAKI, S.; KUROKAWA, T.; OGURA, J.; KOBAYASHI, M.; HIRANO, T.; SUGAWARA, M.; ISEKI, K. In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 403, n. 1-2, p. 136–138, 2011.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. **Journal of Medicinal Food**, v. 3, n. 2, p. 121–125, 2000.

SCHINELLA, G.; FANTINELLI, J. C.; MOSCA, S. M. Cardioprotective effects of *Ilex paraguariensis* extract: Evidence for a nitric oxide-dependent mechanism. **Clinical Nutrition**, v. 24, n. 3, p. 360–366, 2005.

SCHOLZ, S.; WILLIAMSON, G. Interactions affecting the bioavailability of dietary polyphenols in vivo. **International journal for vitamin and nutrition research. Internationale Zeitschrift fur**

**Vitamin- und Ernährungsforschung. Journal international de vitaminologie et de nutrition**, v. 77, n. 3, p. 224–235, 2007.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutricao**, v. 15, n. 1, p. 71–81, 2002.

SORG, O. Oxidative stress: A theoretical model or a biological reality? **Comptes Rendus - Biologies**, v. 327, n. 7, p. 649–662, 2004.

SOUSA, C. M. D. M.; ROCHA, H.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; M, P. B. De; BRANDÃO, M. S.; QUÍMICA, D. De; FEDERAL, U.; PI, T.; MART, T.; MOORE, M. H. E. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351–355, 2007.

SPARG, S. G.; LIGHT, M. E.; VAN STADEN, J. Biological activities and distribution of plant saponins. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 2-3, p. 219–243, 2004.

SPENCER, J. P. E.; ABD EL MOHSEN, M. M.; MINIHANE, A.-M.; MATHERS, J. C. Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. **The British Journal of Nutrition**, v. 99, p. 12–22, 2008.

STALMACH, A.; MULLEN, W.; BARRON, D.; UCHIDA, K.; YOKOTA, T.; CAVIN, C.; STEILING, H.; WILLIAMSON, G.; CROZIER, A. Metabolite profiling of hydroxycinnamate derivatives in plasma and urine after the ingestion of coffee by humans: Identification of biomarkers of coffee consumption. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 37, n. 8, p. 1749–1758, 2009.

STALMACH, A.; STEILING, H.; WILLIAMSON, G.; CROZIER, A. Bioavailability of chlorogenic acids following acute ingestion of coffee by humans with an ileostomy. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 501, p. 98–105, 2010.

STALMACH, A.; WILLIAMSON, G.; CROZIER, A. Impact of dose on the bioavailability of coffee chlorogenic acids in humans. **Food & Function**, v. 5, p. 1727–1737, 2014.

STEIN, J. H.; KEEVIL, J. G.; WIEBE, D. A.; AESCHLIMANN, S.; D.FOLTS, J. Susceptibility of LDL cholesterol to oxidation in patients with coronary artery disease. Purple grape juice improves endothelial function and reduces the disease. **Circulation**, v. 100, p. 1050–1055, 1999.

STRASSMANN, B. B.; VIEIRA, A. R.; PEDROTTI, E. L.; MORAIS, H. N. F.; DIAS, P. F.; MARASCHIN, M. Quantitation of methylxanthinic alkaloids and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis*) and their effects on blood vessel formation in chick embryos. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 18, p. 8348–53, 2008.

TAKENAKA, M.; NAGATA, T.; YOSHIDA, M. Stability and bioavailability of antioxidants in garland (Chrysanthemum coronarium L.). **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 64, n. 12, p. 2689–2691, 1 jan. 2000.

TAKETA, a. T. C.; BREITMAIER, E.; SCHENKEL, E. P. Triterpenes and triterpenoidal glycosides from the fruits of *Ilex paraguariensis* (Mat??). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 2, p. 205–211, 2004.

VAYA, J.; AVIRAM, M. Nutritional antioxidants: Mechanisms of action, analyses of activities and medical applications. **Current Medicinal Chemistry - Immunology Endocrine & Metabolic Agents**, p. 99–117, 2001.

VIDOR, M. A.; RUIZ, C. P.; MORENO, S. V.; FLOSS, P. A. Marcadores moleculares em estudos de caracterização de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St.Hil.): o sabor. **Ciência Rural**, v. 32, n. 3, p. 415–420, 2002.

VIEIRA, M. a.; MARASCHIN, M.; PAGLIOSA, C. M.; PODESTÁ, R.; DE SIMAS, K. N.; ROCKENBACH, I. I.; AMBONI, R. D. D. M. C.; AMANTE, E. R. Phenolic acids and methylxanthines composition and antioxidant properties of mate (*Ilex paraguariensis*) residue. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 3, p. 280–285, 2010.

WILLIAMSON, G.; DIONISI, F.; RENOUF, M. Flavanols from green



tea and phenolic acids from coffee: Critical quantitative evaluation of the pharmacokinetic data in humans after consumption of single doses of beverages. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 55, n. 6, p. 864–873, 2011.

WILLIAMSON, G.; MANACH, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans.II. Review of 93 intervention studies. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 81, p. 243S–255S, 2005.

ZAMORA-ROS, R.; LLORACH, R.; ANDRES-LACUEVA, C. Application of dietary phenolic biomarkers in epidemiology: Past, present, and future. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 6648–6657, 2012.



**APÊNDICE A – QUESTIONÁRIO DE INCLUSÃO AO ESTUDO*****Questionário Clínico***

Questionário Inclusão: **Deteção de metabólitos de ACG no plasma e urina de indivíduos saudáveis após a ingestão de Erva-mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil).**

Participante N° |\_|\_|\_|

Identificação:

Nome:

Telefone:

Sexo: ☐ masculino ☐ feminino

Idade:

Raça: ☐ branco ☐ pardo ☐ amarelo ☐ negro

Diagnóstico nutricional: Peso -

Altura -

IMC -

Morbidades:

- |                                |                              |                              |
|--------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 1. Diabetes mellitus           | <input type="checkbox"/> sim | <input type="checkbox"/> não |
| 2. Câncer                      | <input type="checkbox"/> sim | <input type="checkbox"/> não |
| 3. Doença Arterial Coronariana | <input type="checkbox"/> sim | <input type="checkbox"/> não |
| 4. Doenças gástricas           | <input type="checkbox"/> sim | <input type="checkbox"/> não |
| 5. Doenças renais              | <input type="checkbox"/> sim | <input type="checkbox"/> não |
| 6. Doenças hepáticas           | <input type="checkbox"/> sim | <input type="checkbox"/> não |
| 7. Doença Parkinson            | <input type="checkbox"/> sim | <input type="checkbox"/> não |
| 8. Doença de Alzheimer         | <input type="checkbox"/> sim | <input type="checkbox"/> não |
| 9. Hipertireoidismo            | <input type="checkbox"/> sim | <input type="checkbox"/> não |
| 10. Hipotireoidismo            | <input type="checkbox"/> sim | <input type="checkbox"/> não |

11. Antecedentes de Morbidades (cirurgias, processo inflamatório recente ou infeccioso):

Hábitos:

1. Tabagismo: ☐ sim ☐ não

Quantos cigarros por dia:

2. Bebida Alcoólica: ☐ sim ☐ não

Frequente: ☐ sim ☐ não

Raramente: ☐ sim ☐ não

3. Medicação em uso

☐ Nenhuma ☐ Diurético ☐ Outros

Medicamentos \_\_\_\_\_

☐ Vit. A ou carotenóides ☐ Vit. C ☐ Vit. E ☐

Multivitaminas

☐ Cápsulas de chá branco/verde ☐ Extratos Vegetais ☐ Óleo

de peixe

Anticoncepcional: ☐ Oral ☐ Injetável ☐ Intradérmico

**Outros:**

Hipersensibilidade à erva-mate: ☐ sim ☐ não

Hipersensibilidade à cafeína: ☐ sim ☐ não

Gestante: ☐ sim ☐ não

Lactante: ☐ sim ☐ não

Assinatura do participante

\_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador

\_\_\_\_\_

## **APÊNDICE B – ORIENTAÇÕES AOS PARTICIPANTES**

### **ORIENTAÇÕES GERAIS**

- Evitar o consumo de alimentos ricos em ácidos fenólicos e saponinas 48 horas antes do estudo (Ex: chá, café, sucos naturais, frutas, legumes, chocolate, cereais, grãos, feijão e lentilha).
- No dia anterior ao estudo iniciar um jejum de 12 horas para determinação de perfil lipídico e para que não haja interferência da amostra no tempo 0.
- Será realizada uma coleta de sangue antes da ingestão de chá e após, nos tempos, 1, 1.5, 2, 3 e 4 horas.
- As amostras de urina serão coletadas durante as 4 horas de duração do estudo. Em caso de necessidade ou dúvidas, comunicar as responsáveis.
- Você poderá fazer um lanche após 2 horas da ingestão do extrato de erva-mate.



## ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA  
CATARINA - UDESC  
GABINETE DO REITOR  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES  
HUMANOS – CEP SH

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O(a) senhor(a) está sendo convidado a participar de uma pesquisa de mestrado intitulada **Biodisponibilidade de saponinas e do ACG em indivíduos saudáveis após a ingestão aguda de erva-mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.)**. A pesquisa fará a avaliação de amostras de sangue e urina, tendo como objetivo principal avaliar a biodisponibilidade das saponinas e do ACG após a ingestão da infusão de erva-mate verde (*Ilex paraguariensis*). Os objetivos específicos do projeto, incluem a identificação e quantificação de saponinas e seus metabólitos por meio da medida do ácido ursólico e/ou oleanólico e dos metabólitos do ACG no plasma e urina após ingestão aguda de erva-mate.

Serão previamente marcados a data e horário para a coleta das amostras de sangue e urina. Essas coletas serão realizadas no Laboratório de Pesquisa em Lipídeos, Antioxidantes e Aterosclerose, localizado no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Departamento de Análises Clínicas, Bloco K, 1º andar, sala nº 110.

Na semana que antecede à coleta de sangue e urina para a pesquisa, será aplicado um questionário de avaliação clínica, assim como será realizada uma coleta de sangue para os exames de hematócrito e hemoglobina. Mulheres em período de gestação ou lactantes e indivíduos sensíveis à erva-mate (principalmente à cafeína, responsável por provocar desconforto gástrico e azia, tremores, taquicardia e/ou insônia) não poderão participar do estudo. O exame de gravidez será realizado previamente com as candidatas ao estudo, sem ônus para as participantes. A detecção da beta Gonadotrofina Coriônica livre (Beta-HCG) será feita em amostra de urina da participante, no setor

de Urinálise do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC).

Para a demonstração de que os constituintes da erva-mate são absorvidos e aparecem no sangue e na urina (biodisponibilidade), o(a) senhor(a) irá ingerir 500 mL da infusão de erva-mate. A infusão deverá ser ingerida em 5 minutos. O laboratório que irá coletar, transportar e beneficiar a erva-mate será, SUSTENTEC - Produtores Associados para Desenvolvimento de Tecnologias Sustentáveis; Endereço: Fazenda Britânia, Perímetro 22, Lote Rural 165 B/B – Pato Bragado PR – CEP 85948-000, CNPJ: 06.044.305/0001-80.

Precisamos da sua autorização para a realização de exame clínico por meio de um questionário, coleta de urina antes e após a ingestão da infusão de erva-mate e coletas de 6 mL de sangue, em jejum de 12 horas, e após 0,5, 1, 2, 3 e 4 horas da ingestão da infusão. As coletas de sangue serão feitas por profissionais qualificados utilizando procedimentos padronizados. Todos os materiais utilizados para coleta de sangue e de urina serão descartáveis.

Os riscos desses procedimentos serão médios. As coletas de sangue poderão provocar desconforto, dores e/ou formação de hematomas por consequência de possíveis acidentes de punção. Também poderá ocorrer mal estar após a ingestão da infusão de erva-mate, como desconforto gástrico e azia, tremores e/ou taquicardia e, caso seja necessário, os participantes serão encaminhados imediatamente ao pronto socorro do Hospital Universitário da UFSC.

A sua identidade será preservada, pois cada indivíduo será identificado por um número.

Os benefícios da participação neste estudo envolvem a contribuição científica na confirmação da biodisponibilidade de alguns dos principais constituintes bioativos da erva-mate (saponinas e ACG) em seres humanos. Esperamos, também, que este estudo aumente o nível de conhecimento sobre as propriedades benéficas à saúde humana creditadas à erva-mate.

O(A) senhor(a) deverá manter os seus hábitos de vida regulares durante os dias que antecedem a coleta de sangue do estudo, como por exemplo, a prática ou não de atividades físicas. Em relação à sua alimentação nos dois dias que antecedem à coleta, o(a) senhor(a) deverá restringir o consumo de alimentos como ervilha, grão de bico, feijão, lentilha e bebidas como café, chá preto, chá verde ou bebidas à base de erva-mate (ricos em saponinas e ácidos hidroxicinâmicos).



As pessoas que estarão acompanhando os procedimentos serão as pesquisadoras, estudantes de mestrado, Fernanda Alves da Cruz (farmacêutica bioquímica) e Tatiana de Lima Alves (farmacêutica bioquímica) bem como o pesquisador responsável e orientador do projeto, Professor Dr. Edson Luiz da Silva.

O(a) senhor(a) poderá se retirar do estudo a qualquer momento, sem qualquer tipo de constrangimento.

Solicitamos a sua autorização para o uso de seus dados para a produção de artigos técnicos e científicos. A sua privacidade será mantida através da não identificação do seu nome.

Este termo de consentimento livre e esclarecido é feito em duas vias, sendo que uma delas ficará em poder do pesquisador e outra com o sujeito participante da pesquisa.

Agradecemos a sua participação.

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Professor Dr. Edson Luiz da Silva

**TELEFONE PARA CONTATO:** (48) 37219712, Ramal 219

**ENDEREÇO:** Rua Delfino Conti s/n - Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde, Bloco K – 1º Andar, Sala 110, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) – Campus Universitário – Bairro Trindade – CEP: 88.040-370

### **ASSINATURA DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL**

Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos – CEPESH/UDESC

Av. Madre Benvenuta, 2007 – Itacorubi – Fone: (48)3321-8195 – e-mail: cepsh.reitoria@udesc.br

Florianópolis - SC

88035-001

**TERMO DE CONSENTIMENTO**

Declaro que fui informado sobre todos os procedimentos da pesquisa e, que recebi de forma clara e objetiva todas as explicações pertinentes ao projeto e, que todos os dados a meu respeito serão sigilosos. Eu compreendo que neste estudo, as medições dos experimentos/procedimentos de tratamento serão feitas em mim, e que fui informado que posso me retirar do estudo a qualquer momento.

Nome por extenso \_\_\_\_\_

Assinatura \_\_\_\_\_ Local: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ .

Edson Luiz da Silva  
e Tatiana de Lima Alves  
Pesquisador Responsável  
Fone: (48) 3721-9712;  
R.219; (48) 99559509;  
R. 219  
[edson.silva@ufsc.br](mailto:edson.silva@ufsc.br)

Fernanda Alves da Cruz  
  
Pesquisadoras  
Fones: (48) 3721-9712  
  
(48) 99143554  
[feralvescruz@gmail.com](mailto:feralvescruz@gmail.com)  
[tati\\_limaalves@hotmail.com](mailto:tati_limaalves@hotmail.com)